



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

TIAGO DANELLI

***Staphylococcus aureus* OXACILINA-SENSÍVEL
mecA-POSITIVO (OS-MRSA): REVISÃO E ANÁLISE
GENÔMICA**

Londrina
2024

TIAGO DANELLI

***Staphylococcus aureus* OXACILINA-SENSÍVEL *mecA*-POSITIVO
(OS-MRSA): REVISÃO E ANÁLISE GENÔMICA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^a. Dra. Márcia Regina Eches Perugini

Londrina
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

T551s Danelli, Tiago.

Staphylococcus aureus OXACILINA-SENSÍVEL *mecA*-POSITIVO (OS-MRSA): REVISÃO E ANÁLISE GENÔMICA / Tiago Danelli. - Londrina, 2024.
74 f. : il.

Orientador: Marcia Regina Eches Perugini.

Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2024.

Inclui bibliografia.

1. Infecções bacterianas - Tese. 2. Resistência a metilina - Tese. 3. Sequenciamento completo do genoma - Tese. 4. Genes MDR - Tese. I. Perugini, Marcia Regina Eches. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. III. Título.

CDU 579

TIAGO DANELLI

***Staphylococcus aureus* OXACILINA-SENSÍVEL
mecA-POSITIVO (OS-MRSA): REVISÃO E ANÁLISE
GENÔMICA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA:

(Orientadora) Prof^ª. Dra. Marcia Regina Eches
Perugini UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA

Prof^ª. Dra. Daniele Zendrini Rechenchoski
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA

Prof^ª. Dra. Eliana Carolina Vespero
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA

Prof^ª. Dra. Gilselena Kerbauy Lopes
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA

Prof^ª. Dra. Zuleica Naomi Tano
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA

Londrina, 20 de agosto de 2024.

Dedico este trabalho ao amor da minha vida,
minha esposa Géssica, que esteve ao meu lado
em todos os momentos nesta jornada.
Companheira fiel desde o dia que a conheci, nos
momentos felizes e nos nem tanto assim.
Se hoje estou aqui, ela é responsável por isso!

AGRADECIMENTOS

Não poderia começar agradecendo a outra pessoa que não fosse ela, minha orientadora, Profa. Dra. Marcia R. E. Perugini. Sou grato por todo o conhecimento cedido a min, pelos anos dedicados à minha carreira acadêmica, por toda preocupação com prazos, pelo acolhimento em momentos difíceis (e foram muitos), pela paciência, pelo zelo, pela oportunidade de ser palestrante em eventos a seu lado, quanta honra! Enfim, por todos aqueles motivos que eu ficaria linhas e mais linhas deste texto agradecendo. Jamais esquecerei da senhora, a primeira voz que ouvi aqui na UEL!

Agradeço à banca, as professoras: Dra. Daniela Frizon Alfieri, Dra. Daniele Zendrini Rechenchoski, Dra. Eliana Carolina Vespero, Dra. Gilselena Kerbauy Lopes e Dra. Zuleica Naomi Tano, pelas correções e orientações a este trabalho. Suas contribuições foram de extrema importância. Vocês são fonte de inspiração para mim!

Aos pais de minha esposa, Rosemari e Givaldo, que nunca mediram esforços para nos ajudar desde que nos mudamos para Londrina. A casa deles sempre foi refúgio, um lugar de descanso para nós, um lugar de esquecer dos problemas por um momento.

Aos colegas de pesquisa, por toda parceria destes anos. Destaco aqui a parceria que sempre tive com o Felipe Crepaldi Duarte. Um irmão de pesquisa e que muito colaborou para que este dia chegasse. Ele foi e é um grande apoiador, incentivador e colaborador. É também um viciado em café, sendo grande companheiro da melhor hora do dia, aquele cafezinho enquanto aguardávamos as reações de PCR terminarem. Muito obrigado irmão.

Aos colegas de trabalho, os amigos que a vida me deu aqui na UEL e para fora daqui também. Não vou citar nomes para não esquecer de ninguém. Mas saibam, que muito levo de vocês comigo. Sou muito grato por toda ajuda, troca de experiência e momentos agradáveis que tivemos. Espero poder sempre os ajudar e ser seu companheiro para o que der e vier.

Aos demais professores do CCS e CCB, pelo conhecimento, gentileza nas explicações, conselhos e o apoio. Muito aprendi e vou continuar aprendendo com vocês.

Assim como comecei agradecendo a uma pessoa importantíssima em minha vida, termino agradecendo a outra. Sem essa pessoa eu simplesmente não estaria aqui hoje. Quem me deu educação, valores e que também com seu sacrifício, sangue, suor e lágrimas eu cheguei até aqui. A pessoa que me deu a vida, minha mãe... te amo! Muito obrigado!

Gostaria de terminar dizendo que na vida temos muitas fases, umas boas, outras ruins e ainda, outras muito ruins. Os últimos anos foram muito bons e ao mesmo tempo muito ruins

para mim. Digo seguramente que foram os anos mais difíceis que já passei. Tiveram muitas alegrias, mas também muitas dores. Só nós sabemos. Encaro esse doutorado como um divisor de águas, pois venho em um processo de cura de feridas psicológicas, que sim, só eu conheço todas. Essa titulação encerra um ciclo e daqui pra frente começará outro e eu estou mais preparado que nunca para encará-lo, apoiado pela minha família e amigos. Sigo firme, sempre fazendo o bem e tentando fazer do próximo dia sempre melhor que o anterior.

“[...] sua origem diz muito sobre você. Seja bom, honesto e respeitoso, ensine isso a seus filhos, assim, quando dizer seu sobrenome todos saberão que é pessoa de bem!”

(Gentil Danelli, meu avô)

DANELLI, Tiago. *Staphylococcus aureus* OXACILINA-SENSÍVEL *mecA*-POSITIVO (OS-MRSA): REVISÃO E ANÁLISE GENÔMICA. 2024. 74 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2024.

RESUMO

Staphylococcus aureus é um microrganismo que apresenta grande variabilidade genética e tem ocorrência mundial. Tem em um grande potencial patogênico, pois possui um extenso arsenal de fatores de virulência, que promovem diferentes efeitos biológicos no hospedeiro. Dentre estes, podemos destacar a leucocidina de Pantón-Valentine, a toxina da síndrome do choque tóxico 1 e a capacidade de formar biofilme. *S. aureus* pode invadir e infectar diversos órgãos e tecidos e também replicar-se e disseminar-se para muitos locais diferentes, causando infecções graves, podendo levar à sepse. Pode apresentar resistência a vários antibióticos, dentre estas, a principal é a resistência a meticilina, mediada pelo gene *mecA*. Entretanto, outra população de MRSA tem despertado atenção, uma vez que os isolados se apresentam como sensíveis à meticilina em testes fenotípicos, mas possuem o gene *mecA*. Estudos genéticos demonstraram a presença de genes que não estavam relacionados com *mecA*, mas que ainda assim influenciavam no nível de resistência a meticilina, os genes *femXAB*. Foi realizada a extração do DNA bacteriano e realizado o sequenciamento do genoma da cepa *S. aureus* 549 isolada de infecção de corrente sanguínea de paciente com choque séptico. Posteriormente, foi realizada a montagem e análise do genoma para a identificação do cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*), *spa type*, presença de plasmídeos, presença de genes de resistência antimicrobiana e de virulência e busca por mutações nos genes *femXAB*. Foi possível evidenciar que *S. aureus* 549 pertencia ao ST1 e *spa type* t922, que possuía o SCC*mec* tipo IVa e também possuía genes de virulência para a leucocidina de Pantón-Valentine e para formação de biofilme. Embora tenha se mostrado sensível à meticilina, portava o gene *mecA*, sendo resistente aos β -lactâmicos e classificada como *S. aureus* oxacilina-sensível *mecA*-positivo (OS-MRSA). Também foram identificadas mutações em *femX* (I51V) e *femA* (Q36E e Y195F), genes relacionados com a formação do peptidoglicano. Mutações em *femX* sugerem fortemente que a cepa 549 OS-MRSA também poderia ter a expressão de *femX* diminuída. Mutações em *femA* podem estar associadas a OS-MRSA ou à restauração da sensibilidade a oxacilina em MRSA. Pesquisas focadas em fatores adjacentes a *mecA* podem revelar possíveis alvos farmacológicos, como as proteínas resultantes dos genes *fem*.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*; infecções bacterianas; resistência a meticilina; sequenciamento completo do genoma; genes MDR.

DANELLI, Tiago. **OXACILLIN-SUSCEPTIBLE *mecA*-POSITIVE *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA): REVIEW AND GENOMIC ANALYSIS**. 2024. 74 p. Thesis (Doctorate in Clinical and Laboratory Physiopathology) - State University of Londrina, Londrina. 2024.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a microorganism with great genetic variability and is found worldwide. It has great pathogenic potential, as it has an extensive arsenal of virulence factors that promote different biological effects on the host. Among these, we can highlight Panton-Valentine leukocidin, toxic shock syndrome toxin 1 and the ability to form biofilm. *S. aureus* can invade and infect various organs and tissues and also replicate and spread to many different sites, causing serious infections that can lead to sepsis. It can present resistance to several antibiotics, the main one being resistance to methicillin, mediated by the *mecA* gene (MRSA). However, another population of MRSA has attracted attention, since the isolates are susceptible to methicillin in phenotypic tests, but possess the *mecA* gene. Genetic studies demonstrated the presence of genes that were not related to *mecA* but still influenced the level of methicillin resistance, the *femXAB* genes. Bacterial DNA was extracted and the genome of the *S. aureus* 549 strain isolated from a bloodstream infection of a patient with septic shock was sequenced. Subsequently, the genome was assembled and analyzed to identify the staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*), *spa* type, presence of plasmids, presence of antimicrobial resistance and virulence genes, and search for mutations in the *femXAB* genes. It was possible to demonstrate that *S. aureus* 549 belonged to ST1 and *spa* type t922, that it had SCC*mec* type IVa and also had virulence genes for Panton-Valentine leukocidin and biofilm formation. Although it was shown to be susceptible to methicillin, it carried the *mecA* gene, being resistant to β -lactams and classified as oxacillin-susceptible *mecA*-positive *S. aureus* (OS-MRSA). Mutations in *femX* (I51V) and *femA* (Q36E and Y195F), genes related to peptidoglycan formation, were also identified. Mutations in *femX* strongly suggest that strain 549 OS-MRSA could also have decreased *femX* expression. Mutations in *femA* may be associated with OS-MRSA or with the restoration of oxacillin susceptibility in MRSA. Research focused on factors adjacent to *mecA* may reveal possible pharmacological targets, such as proteins resulting from *fem* genes.

Key words: *Staphylococcus aureus*; bacterial infections; methicillin resistance; whole genome sequencing; genes MDR.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 – Estruturas dos tipos de cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) conhecidos23

Figura 2 – Estágios da via de biossíntese do peptidoglicano29

TRABALHO 2

Figura 1 – Alinhamento de sequência e tradução do gene *femX* do isolado *Staphylococcus aureus* 549 sensível a oxacilina *mecA* positivo (OS-MRSA), com a sequência da cepa SAW1 de *S. aureus*, resistente à oxacilina48

Figura 2 – Alinhamento de sequência e tradução do gene *femA* do isolado *Staphylococcus aureus* 549 sensível a oxacilina *mecA* positivo (OS-MRSA), com a sequência da cepa SAW1 de *S. aureus*, resistente à oxacilina49

Figura 3 – Destaques mostrados na Figura 1 indicando uma mutação no gene *femX* do isolado *Staphylococcus aureus* 549 sensível a oxacilina *mecA* positivo (OS-MRSA) (I51V)50

Figura 4 – Destaques mostrados na Figura 3 indicando uma mutação no gene *femA* do isolado *Staphylococcus aureus* 549 sensível a oxacilina *mecA* positivo (OS-MRSA) a) Q36E and b) Y195F50

LISTA DE TABELAS

TRABALHO 2

Tabela 1 – Análise do genoma de <i>Staphylococcus aureus</i> 549	47
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A-E-K-A-A	A: L-alanina, E: D-glutamato, K: L-lisina, A-A: D-alanina-D-alanina
<i>aux</i>	Nomenclatura alternativa em desuso para os genes <i>fem</i> .
BR-VRSA	<i>Brazilian Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus</i>
CA-MRSA	<i>Community-associated Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
CCB	Centro de Ciências Biológicas
CDC	<i>Center of Diseases Control and Prevention</i>
CEP/UEL	Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina
CIM	Concentração inibitória mínima
ClfA	<i>Clumping factor A</i>
ClfB	<i>Clumping factor B</i>
<i>coa</i>	Gene que codifica a proteína coagulase
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i>
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ESKAPE	Acrônimo para: <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Enterobacter</i> spp.
EUA	Estados Unidos da América
FemA	Proteína que adiciona a segunda e a terceira glicinas da ponte interpeptídica de pentaglicina do peptidoglicano de <i>Staphylococcus</i> spp.
FemB	Proteína que adiciona a quarta e a quinta glicinas da ponte interpeptídica de pentaglicina do peptidoglicano de <i>Staphylococcus</i> spp.
FemX	Proteína que adiciona a primeira glicina da ponte interpeptídica de pentaglicina do peptidoglicano de <i>Staphylococcus</i> spp.
<i>fem</i>	Gene envolvido na biossíntese da ponte interpeptídica de pentaglicina do peptidoglicano de <i>Staphylococcus</i> spp.
<i>femA</i>	Gene relacionado com a deposição da segunda e da terceira glicinas da ponte interpeptídica de pentaglicina do peptidoglicano de <i>Staphylococcus</i> spp.

<i>femB</i>	Gene relacionado com a deposição da quarta e da quinta glicinas da ponte interpeptídica de pentaglicina do peptidoglicano de <i>Staphylococcus</i> spp.
<i>femX</i>	Gene relacionado com a deposição da primeira glicina da ponte interpeptídica de pentaglicina do peptidoglicano de <i>Staphylococcus</i> spp.
<i>femXAB</i>	Operon relacionado com a biossíntese da ponte interpeptídica de pentaglicina do peptidoglicano de <i>Staphylococcus</i> spp.
FemXAB	Proteínas relacionadas com a biossíntese da ponte interpeptídica de pentaglicina do peptidoglicano de <i>Staphylococcus</i> spp.
GlcNAc	Ácido N-acetilglucosamina
HA-MRSA	<i>Healthcare-associated Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
HCl	Ácido clorídrico
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HU-UEL	Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina
hVISA	<i>Heteroresistant vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus</i>
I51V	Mutação em <i>femX</i>
<i>ica</i>	Operon relacionado com a produção de biofilme
<i>icaA</i>	Gene relacionado com a produção de biofilme
IcaA	Proteína transmembranar relacionada com a produção de biofilme
<i>icaB</i>	Gene relacionado com a produção de biofilme
IcaB	Proteína transmembranar relacionada com a produção de biofilme
<i>icaC</i>	Gene relacionado com a produção de biofilme
IcaC	Proteína transmembranar relacionada com a produção de biofilme
<i>icaD</i>	Gene relacionado com a produção de biofilme
IcaD	Proteína transmembranar relacionada com a produção de biofilme
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
Kb	Quilobase
KDa	Kilodalton
LAC	Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas
<i>lukF-PV</i>	Gene que codifica a leucocidina de Panton-Valentine
<i>lukS-PV</i>	Gene que codifica a leucocidina de Panton-Valentine
MAMP	<i>Microorganism-associated molecular pattern</i>
MDR	Multidrug resistance
<i>mecA</i>	Gene relacionado à resistência a meticilina
<i>mecB</i>	Gene relacionado à resistência a meticilina

<i>mecC</i>	Gene relacionado à resistência a meticilina
<i>mecD</i>	Gene relacionado à resistência a meticilina
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMMs	<i>Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules</i>
MSSA	<i>Methicillin-susceptible Staphylococcus aureus</i>
Mu3	Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> com resistência tipo hVISA
Mu50	Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> com resistência tipo VISA
Mur	Proteínas citoplasmáticas que sintetizam pentapeptídeo
MurNAc	Ácido N-acetilmurâmico
MurT/GatD	Complexo proteico responsável pela inversão através da membrana do pentapeptídeo Lipídeo-II nos <i>Staphylococcus aureus</i> .
NIP5	Laboratório de biologia molecular de microrganismos
<i>nuc</i>	Gene que codifica termonuclease
OMS	Organização Mundial da Saúde
OS-MRSA	<i>Oxacillin-susceptible mecA-positive Staphylococcus aureus</i>
PAC	Pneumonia associada à comunidade
PAV	Pneumonia associada à ventilação mecânica
pb	Pares de bases
pBBB31	Plasmídeo que codifica <i>femA</i>
PBP	<i>Penicillin binding protein</i>
PBP2a	<i>Penicillin binding protein 2a</i>
pI258	Plasmídeo relacionado com a resistência a eritromicina em <i>Staphylococcus aureus</i>
PIA	Polissacarídeo de Adesão Intercelular
PMNs	Polimorfonucleares
PVL	<i>Panton-Valentine leukocidin</i>
Q36E	Mutação em <i>femA</i>
SAGs	Superantígenos
SCC <i>mec</i>	<i>Staphylococcal cassette chromosome mec</i>
SCN	<i>Staphylococcus</i> spp. coagulase negativa
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SQW1	Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
SST	<i>Toxic shock syndrome</i>

TENTS	Tris-EDTANaCl-TritonX100
Tn55I	Transposon localizado no plasmídeo pI258 de <i>Staphylococcus aureus</i>
TSST-1	<i>Toxic shock syndrome toxin 1</i>
<i>tst</i>	Gene que codifica a toxina da síndrome do choque tóxico 1
UEL	Universidade Estadual de Londrina
USP	Universidade de São Paulo
UTI	Unidade de terapia intensiva
<i>vanA</i>	Gene associado à resistência a vancomicina
VISA	<i>Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus</i>
VRSA	<i>Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus</i>
Y195F	Mutação em <i>fenA</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	16
1.2	FATORES DE VIRULÊNCIA	18
1.3	INFECÇÕES POR <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	21
1.4	RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	22
1.5	OPERON <i>FEMXAB</i>	27
2	JUSTIFICATIVA	30
3	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVO GERAL	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	32
4.1	LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO	32
4.2	DELINEAMENTO	32
4.3	MÉTODOS FENOTÍPICOS	33
4.3.1	Identificação de <i>Staphylococcus aureus</i> e Avaliação da Sensibilidade aos Antimicrobianos	33
4.4	MÉTODOS GENOTÍPICOS	33
4.4.1	Extração de DNA	33
4.4.2	PCR Convencional	34
4.4.3	Sequenciamento do Genoma	34
4.4.4	Número de Acesso ao GenBank	34
4.4.5	Análise Genômica Ampliada	35
5	RESULTADOS	36
	ARTIGO 1 – OS-MRSA ISOLATES AS A CAUSE OF MAJOR CLINICAL DIFFICULTY: DIAGNOSTIC AND TREATMENT DIFFICULTIES	37
	ARTIGO 2 – MUTAÇÃO EM <i>FEMX</i> E <i>FEMÁ</i> E SUA RELAÇÃO COM <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> SENSÍVEL A OXACILINA <i>MECÁ</i> POSITIVO (OS-MRSA)	43
6	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são um grave problema de saúde global pois afetam milhões de pacientes em todo o mundo, sua prevalência varia em diferentes regiões. O problema se agrava em unidades de terapia intensiva (UTIs), especialmente quando causadas por microrganismos multirresistentes. As consequências dessas infecções incluem prejuízos na saúde dos pacientes, internações prolongadas, piores desfechos clínicos e altas taxas de mortalidade (Cantón, Gijón e Ruiz-Garbajosa, 2020; Weiner-Lastinger *et al.*, 2020).

Globalmente, patógenos multirresistentes a antimicrobianos são responsáveis por cerca de 700.000 mortes a cada ano e até 2050 estima-se que a mortalidade aumentará para 10 milhões de óbitos ao ano, caso medidas preventivas e de controle para conter a resistência microbiana não sejam adotadas (Abubakar *et al.*, 2023).

Embora o surgimento de microrganismos multirresistentes continue a aumentar, a disponibilidade de agentes antimicrobianos tem diminuído, o que poderá torná-los ineficazes dentro de uma década, levando a condições semelhantes às da era pré-antibióticos. O grupo de bactérias multirresistentes que causa grande preocupação e gera grandes impactos à saúde foi designado com o acrônimo 'ESKAPE', por escaparem dos antimicrobianos. O grupo inclui *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. (De Oliveira *et al.*, 2020; Junior *et al.*, 2023).

O constante aumento de casos de IRAS causadas por bactérias resistentes a antimicrobianos, verificados nos últimos anos, levou a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2017, a enfatizar a necessidade de desenvolvimento de novas alternativas antimicrobianas para combater os patógenos responsáveis por essas infecções. Esta lista compreende doze gêneros incluindo bactérias Gram-negativas e Gram-positivas divididos em três categorias: prioridade crítica, alta e média, dependendo da necessidade de novos antimicrobianos. Entre as espécies, a categoria de alta prioridade inclui *S. aureus* resistentes a meticilina e intermediário/resistente à vancomicina (Babu Rajendran *et al.*, 2020).

A vigilância da resistência antimicrobiana é uma ferramenta importante para estabelecer melhores diretrizes para terapia antimicrobiana empírica e prevenir a disseminação de microrganismos multirresistentes. Além disso, a disseminação de clones de alto risco emergentes têm preocupado os sistemas de saúde (Murray *et al.*, 2022).

Antes da pandemia de COVID-19, as taxas de infecções associadas à assistência à saúde, especialmente em países em desenvolvimento, eram altas. Neste período, a administração

antimicrobiana e as estratégias de controle e prevenção de infecções eram usadas como estratégias de mitigação contra a resistência antimicrobiana. No entanto, o surgimento da pandemia da COVID-19 causou grandes interrupções nos sistemas de saúde que ameaçam a eficácia dessas estratégias (Abubakar *et al.*, 2023).

Nos últimos anos houve um aumento da resistência antimicrobiana, devido ao aumento de exposição ao ambiente hospitalar e aumento do uso de antimicrobianos. Surtos de microrganismos multirresistentes, especialmente *S. aureus*, têm sido relatados em todo o mundo. Por este motivo, é imprescindível que as estratégias de mitigação contra a resistência antimicrobiana tenham o incremento das análises genômicas. A aplicação de tecnologias genômicas avançadas aumenta significativamente a velocidade de diagnóstico de microrganismos resistentes e fornecem dados sobre a complexidade genética destes microrganismos (Arumairaj *et al.*, 2023; Gopikrishnan; Haryini; C, 2024; Knight *et al.*, 2021; Vaillancourt; Jorth, 2020).

1.1 *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Staphylococcus é um gênero de bactérias pertencentes à família Staphylococcaceae composto de 89 espécies e 30 subespécies (LPSN, 2024). Esse gênero se apresenta na forma de cocos Gram-positivos, com tamanho aproximado de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro e podem se agrupar na forma de cachos, aos pares, em tétrades ou em cadeias curtas (Jorgensen *et al.*, 2015). Dentre estes, *Staphylococcus aureus* é um microrganismo de grande importância na saúde humana, compõe a microbiota normal da pele e principalmente da mucosa nasal. Estima-se que 20-30% da população humana sejam portadores persistentes de *S. aureus* nas narinas, aproximadamente 30% são portadores intermitentes e na pele e superfícies de mucosas pode ser um colonizante transitório em 20 a 90% da população saudável. Entretanto, em presença de fatores de risco, pode ser um patógeno oportunista com capacidade de infectar diversos tecidos do corpo humano (Emaneini *et al.*, 2017; Olufunmiso; Tolulope; Roger, 2017; Sarkar *et al.*, 2016).

A colonização por *S. aureus* nas superfícies do homem é resultado de um processo dinâmico que envolve: a) adesão às superfícies do hospedeiro; b) evasão do sistema de defesa do hospedeiro; c) competição com outros microrganismos componentes da microbiota local (Foster *et al.*, 2014). A adesão inicial de *S. aureus* ao epitélio escamoso da mucosa nasal é mediada pelo ácido teicóico presente na parede celular bacteriana (Burian *et al.*, 2010). Posteriormente, a bactéria expressa diferentes proteínas ancoradas à parede celular que são

importantes para o processo de adesão ao epitélio nasal. As proteínas mais prevalentes são aquelas pertencentes à família de componentes microbianos de superfície que reconhecem moléculas adesivas da matriz (MSCRAMMs – *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*). Entre elas, o fator de aglutinação B (do inglês *clumping factor B* - ClfB) é importante para a colonização da mucosa nasal de roedores e do homem (Schaffer *et al.*, 2006; Wertheim *et al.*, 2008; Young *et al.*, 2017). ClfB liga-se a loricrina que é o componente proteico predominante do envelope córneo de células epiteliais escamosas (Mulcahy *et al.*, 2012); bem como à citoqueratina 10, uma proteína que compõe os filamentos do citoesqueleto celular (Walsh *et al.*, 2004).

As proteínas ancoradas à parede celular de *S. aureus* também são importantes para evasão do sistema de defesa do hospedeiro. Proteínas como, fator de aglutinação A (do inglês ClfA, *clumping factor A*) e proteína A interferem na ativação da via clássica do sistema complemento, prevenindo a sua morte (Foster *et al.*, 2014; Hair *et al.*, 2010). Além disso, *S. aureus* replica-se ativamente no epitélio nasal, o que previne sua remoção pela descamação celular e pelo fluxo de muco (Foster *et al.*, 2014).

A competição de *S. aureus* com outras espécies da mucosa nasal tem um papel importante no processo de colonização, podendo ocorrer: 1) competição por locais de adesão e nutrientes. *S. aureus* pode sobreviver em ambientes com poucos nutrientes; 2) competição por antibiose, onde certas bactérias podem produzir moléculas antimicrobianas que inibem possíveis competidores. Por exemplo, *S. lugdunensis* produz um composto antimicrobiano que inibe e destrói *S. aureus*; 3) competição por indução das defesas do hospedeiro, ou seja, *S. aureus* induz a produção de proteínas antimicrobianas do hospedeiro que são mais prejudiciais a outros microrganismos do que a ele próprio (Lee *et al.*, 2018).

Assim, *S. aureus* pode ter uma relação comensal com o homem, na qual desempenha um papel protetor, uma “barreira” contra outros microrganismos potencialmente patogênicos. Todavia, quando o hospedeiro é submetido a tratamento com antimicrobianos, o efeito protetor pode ser reduzido ou eliminado (Kluytmans; Van Belkum; Verbrugh, 1997; Noble *et al.*, 1964). Neste contexto, o indivíduo colonizado por *S. aureus* apresenta um risco potencial de desenvolver infecções por esta bactéria. Crucialmente, o estado imune do hospedeiro, a presença de doença subjacente, bem como o contato com o ambiente hospitalar, podem contribuir para colonização por *S. aureus* resistentes a antimicrobianos neste sítio anatômico, fato que pode levar a diminuição da variabilidade microbiana local (Faria *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2016). Este é um fator preocupante, principalmente no ambiente hospitalar (Calfee, 2012).

Apesar da relação comensal com os seres humanos, quando as barreiras primárias, pele ou mucosas, são rompidas, *S. aureus* pode estabelecer diferentes tipos de infecções em diversos locais, variando de pequenos abscessos a infecções de sítios profundos. As infecções sistêmicas geralmente surgem de focos primários, que incluem dispositivos médicos ou infecções locais de pele e partes moles, articulações, ossos e pulmões (Buchan; Foster; Renshaw, 2019).

De fato, por estar em íntimo contato com os seres humanos, este microrganismo é um importante agente causador de infecções adquiridas no ambiente hospitalar. Além disso, a colonização nasal entre profissionais de saúde pode ser fonte de transmissão de *S. aureus* para pacientes e para o ambiente hospitalar (Emaneini *et al.*, 2017; Francois *et al.*, 2007).

A higienização das mãos antes e depois do contato com pacientes e/ou os equipamentos que este utiliza, uso de paramentação padrão, uso de paramentação cirúrgica para realização de procedimentos invasivos e evitar tocar o nariz durante o trabalho são medidas que reduzem a taxa de transmissão de patógenos. Medidas constantes de treinamento e educação dos profissionais acerca da manutenção da higiene e os efeitos do uso indiscriminado de antimicrobianos devem ser implementadas no controle das infecções (CDC, 2007; Rongpharpi; HazariKa; Kalita, 2013)

1.2 FATORES DE VIRULÊNCIA

S. aureus tem um grande potencial patogênico, pois possui um extenso arsenal de fatores de virulência, que promovem diferentes efeitos biológicos no hospedeiro; sendo os principais: padrão molecular associado ao microrganismo (*microorganism-associated molecular pattern* – MAMP), podendo ser MAMP quimiotático ou não quimiotático; adesinas, tais como proteínas de superfície e glicopeptídeos; evasinas, como inibidores do receptor MAMP, inibidores do receptor de quimiocinas, inibidores de extravasamento de polimorfonucleares, fatores de coagulação, anticoagulantes, inibidores do sistema complemento, inibidores da opsonofagocitose e inibidores da morte por polimorfonucleares; toxinas, por exemplo, toxina formadora de poros, superantígenos (SAGs), esfingomielinase e toxinas proteolíticas; formação de biofilme (Lee *et al.*, 2018).

Entre os fatores de coagulação secretados por *S. aureus* está a coagulase plasmática livre, codificada pelo gene *coa*. A presença desse gene é um critério importante para distinguir *S. aureus* de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa (SCN). *S. aureus* produz coagulase, para polimerizar a fibrina e formar um abscesso encapsulado no local da infecção, englobando polimorfonucleares (PMNs) infiltrados, impedindo assim o influxo de leucócitos. Considera-se

que a atividade aglutinante da coagulase contribua para a coagulação sanguínea sistêmica, permitindo assim a sobrevivência e disseminação endovascular deste microrganismo e levando a uma piora no quadro infeccioso, apresentando um papel importante no processo da sepse (Cheng *et al.*, 2011; Powers; Wardenburg, 2014; Thomer; Schneewind; Missiakas, 2016; Tiwari; Sapkota; Sen, 2008).

A leucocidina de Pantón-Valentine (*Panton-Valentine leukocidin* – PVL) é uma citotoxina formadora de poros em leucócitos, codificada pelos genes *lukS-PV* e *lukF-PV* que podem ser carregados por bacteriófagos (Kaneko *et al.*, 1997). Esta citotoxina é composta pelo componente S (S do inglês *slow*, devido à migração lenta em coluna de cromatografia), responsável pelo reconhecimento do receptor na célula alvo do hospedeiro; e pelo componente F (F do inglês *fast*, devido à migração rápida) de polimerização. Na forma ativa, quatro subunidades de cada componente S e F formam uma estrutura octamérica que resulta na inserção do poro na membrana plasmática da célula alvo, resultando na morte por lise osmótica (DuMont *et al.*, 2014). É uma toxina geralmente relacionada a infecções complicadas da pele e dos tecidos moles, celulite difusa, pneumonia necrotizante e osteomielite (CDC, 2013; Lee *et al.*, 2018; Nhan; Leclercq; Cattoir, 2011; Yamamoto *et al.*, 2010).

A presença desta toxina foi detectada entre isolados de MRSA e MSSA. (Elisabeth *et al.*, 2014). Em particular, a ação leucotóxica da PVL é responsável por altas taxas de mortalidade (até 75%) relatada na pneumonia necrotizante (Gillet *et al.*, 2002). Esta enfermidade caracteriza-se como pneumonia hemorrágica e necrótica que progride rapidamente, podendo causar a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), possivelmente levando a choque séptico e falência de múltiplos órgãos. Dados da literatura indicam que a mortalidade na pneumonia associada à comunidade (PAC) ocasionada por *S. aureus* positivo para PVL situa-se entre 45% e 56% (Elisabeth *et al.*, 2014).

Evidências indicam que isolados CA-MRSA associados à infecções apresentam genes da PVL mais frequentemente do que isolados CA-MRSA associado à colonização (Boyle-Vavra *et al.*, 2005). Entretanto, isolados MRSA PVL positivos foram detectados como colonizantes, de forma persistente, em estudantes da área de saúde. Estes dados indicam o risco de disseminação dessas bactérias tanto no ambiente comunitário, quanto no hospitalar (Bettin; Causil; Reyes, 2012; Ma, Xiao Xue *et al.*, 2011).

SAGs representam uma grande família de exotoxinas com grande capacidade antigênica produzidas por *S. aureus*. Estas proteínas, com massa molecular variando de 19 a 30 kDa são resistentes ao calor, à proteólise e a dessecação (Spaulding *et al.*, 2013). Mais de vinte SAGs diferentes foram caracterizados a partir de diferentes isolados de *S. aureus* e em

aproximadamente 80% dos isolados clínicos pelo menos um gene de SAg estava presente. Entre os SAgS está a toxina da síndrome do choque tóxico 1 (*toxic shock syndrome toxin 1* – TSST-1), responsável pela síndrome do choque tóxico (*toxic shock syndrome* – SST) (Xu; McCormick, 2012). Esta exotoxina é codificada pelo gene *tst*, que pode estar localizado em várias ilhas de patogenicidade e, é responsável por causar uma patologia multissistêmica caracterizada por febre de início rápido, hipotensão, erupção eritematosa e hiperemia da mucosa, seguida de descamação e falência múltipla de órgãos (Durand *et al.*, 2006).

A TSST-1 ativa diretamente os linfócitos T, ligando-se ao receptor de antígeno com forte afinidade e causando a liberação descontrolada de citocinas pró-inflamatórias responsáveis pela sintomatologia da SST. Em geral a SST apresenta uma taxa de mortalidade variando de 4 a 22% (Nhan; Leclercq; Cattoir, 2011).

Outro fator de virulência que *S. aureus* pode apresentar é o crescimento em forma de biofilme, que pode ser definida como uma comunidade de microrganismos aderidos a uma superfície e inseridos em uma matriz extracelular composta por polissacarídeos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. A síntese do exopolissacarídeo é mediada pela expressão do operon *ica*, composto pelos genes *icaA*; *icaB*; *icaC*; *icaD* (Brambilla *et al.*, 2017; Heilmann *et al.*, 1996; Shrestha *et al.*, 2016).

As proteínas transmembranares IcaA e IcaD participam da biossíntese dos oligômeros (10-20 resíduos) de N-acetilglicosamina a partir de UDP-N-acetilglicosamina. A proteína integral de membrana IcaC promove a translocação do Polissacarídeo de Adesão Intercelular (PIA) através da membrana citoplasmática para a superfície da célula. Por vez, IcaB catalisa a deacetilação de Poli-N-acetilglicosamina conferindo uma carga positiva à PIA, acentuando a sua propriedade de adesão e consequentemente a virulência da bactéria (Lavery; Gorman; Gilmore, 2013)

A capacidade de *S. aureus* produzir biofilme pode estar relacionada com o sucesso na adesão à mucosa nasal. Também, quando inseridos em um biofilme estes microrganismos estão em um microambiente favorável ao seu crescimento e manutenção, onde os antibióticos, agentes sanitizantes e células do sistema imune têm dificuldade em eliminar o microrganismo. Além disso, neste microambiente os microrganismos têm maior facilidade para comunicação celular e transferência horizontal de genes. Alguns isolados de *S. aureus* conseguem permanecer viáveis, sob a forma de biofilme, em superfícies inanimadas por longos períodos de tempo (Brambilla *et al.*, 2017; Joshi *et al.*, 2018).

1.3 INFECÇÕES POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Dentre os patógenos Gram-positivos que causam infecções de pele e partes moles, *S. aureus*, incluindo *S. aureus* resistente a meticilina (*methicillin resistant S. aureus* – MRSA), figura como segundo agente mais frequentemente isolado em celulites depois de *Streptococcus* b-hemolíticos, podendo, em alguns casos ser o agente predominante. Entretanto, recentemente observou-se uma tendência de queda nas infecções comunitárias de pele e partes moles causadas por MRSA nos Estados Unidos da América (EUA) (Poulakou; Lagou; Tsiodras, 2019).

A ventilação mecânica é um recurso indispensável para salvar vidas de pacientes em condições críticas. Infelizmente, ser submetido a este procedimento representa alto risco de desenvolver complicações, como pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV), com uma prevalência que varia de 6,6% a 32%, sendo que *S. aureus* é um dos patógenos mais comumente associados à PAV. Além disso, causa uma elevação nos índices de morbidade, mortalidade e tempo de permanência no hospital, particularmente em UTI, bem como aumento nos custos de cuidados (Aykac; Ozsurekci; Tanir Basaranoglu, 2017). A PAC causada por *S. aureus* é uma infecção pouco frequente, mas potencialmente letal. É frequentemente associada à produção de PVL, que é responsável por extensa necrose tecidual e alta taxa de mortalidade (Elisabeth *et al.*, 2014).

Uma vez rompidas as barreiras primárias da pele e mucosas, *S. aureus* pode invadir e infectar diversos órgãos e tecidos e também replicar-se e disseminar-se para muitos locais diferentes, causando manifestações graves, como bacteremia, endocardite infecciosa e abscessos profundos, podendo também levar à sepse. O principal fator de risco para infecção invasiva e bacteremia é o uso de dispositivos médicos, incluindo cateteres venosos centrais, materiais implantados cirurgicamente e próteses ortopédicas. Estes dispositivos fornecem um canal direto para o espaço intravascular. Além disso, comorbidades subjacentes, como diabetes, terapia imunossupressora e câncer, predisõem os indivíduos à bacteremias por *S. aureus* (Thomer; Schneewind; Missiakas, 2016). *S. aureus* é um dos principais causadores de bacteremia, com uma incidência anual de 4,3 a 38,2 casos por 100.000 pessoas/ano nos Estados Unidos em 2014 (Holland; Arnold; Fowler, 2014). Dados atuais demonstram que a bacteremia por *S. aureus* está associada a uma alta mortalidade de até 27% nos primeiros três meses após o diagnóstico, com uma prevalência de até 19,5% na Europa (Böing *et al.*, 2023).

1.4 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Em 1942, logo após a penicilina ser introduzida no mercado, já existiam relatos de *S. aureus* resistente a este fármaco (Rammelkamp; Maxon, 1942). Essa resistência é mediada por penicilinasas que inativam o anel β -lactâmico, devido a aquisição de plasmídeo contendo o gene *bla_Z*. Para contrapor esta resistência, no final da década de 50 foi desenvolvida a meticilina (Celbenin), uma penicilina semissintética resistente a ação das penicilinasas. Entretanto, em 1961, os primeiros isolados MRSA foram reportados no Reino Unido (Harkins *et al.*, 2017; Jevons, 1961; Lobanovska; Pilla, 2017).

O mecanismo de resistência a meticilina, descrito em 1981, se dá pela produção de uma proteína de ligação a penicilina (PBP) modificada, conhecida como PBP2' ou PBP2a, a qual não se liga a maioria das penicilinas semissintéticas, por exemplo, meticilina e oxacilina, bem como a maioria das cefalosporinas. A PBP2a é codificada pelos genes *mecA*, *mecB* ou *mecC*, os quais encontram-se alocados em uma região do genoma bacteriano conhecida como cassete cromossômico estafilocócico *mec* (*Staphylococcal cassette chromosome mec* – SCC*mec*), um elemento genético móvel que pode ser facilmente transferido entre *Staphylococcus* spp. (Becker *et al.*, 2018; Hartman; Tomasz, 1981; IWG-SCC, 2009; Lee *et al.*, 2018). Os elementos SCC*mec* diferem quanto à organização genética e estrutural, sendo, até então, classificados em 15 tipos (Figura 1) (Wolska-Gębarzewska; Międzobrodzki; Kosecka-Strojek, 2023).

Becker *et al.* (2018) reportaram a presença do gene *mecB* alocado em um plasmídeo em *S. aureus*. O isolado foi recuperado de um swab nasal e garganta de um paciente sem sinais de infecção. O mecanismo de resistência codificado por este gene ainda não foi esclarecido. Em 2017, foi relatado outro homólogo de *mecA* em *Macrocooccus caseolyticus* isolados de cães e bois, o qual foi denominado *mecD* e encontra-se alocado em uma ilha de resistência. Este gene confere resistência a todas as classes de antibióticos β -lactâmicos, incluindo ceftobiprole e ceftarolina, os quais foram desenvolvidos para serem utilizados em infecções causadas por MRSA. Análises da sequência nucleotídica mostraram que o gene *mecD* compartilha 66% de identidade com o gene *mecB* (Schwendener; Cotting; Perreten, 2017).

Para *S. aureus*, a resistência tipo MRSA pode ser caracterizada como: 1) presença do gene *mec*, em sua maioria *mecA*; 2) halo de inibição <22 mm em presença de disco de cefoxitina 30 μ g (BrCAST, 2024).

A idade avançada, longos períodos de internação hospitalar, alimentação enteral, dispositivos intravenosos, presença de lesões cutâneas, úlceras e tratamento com antibióticos estão associados com a colonização por MRSA em pacientes hospitalizados. De mesmo modo, a permanência em um quarto de hospital anteriormente ocupado por um paciente infectado por MRSA também foi associada com o aumento do risco de aquisição de MRSA. Quanto ao desenvolvimento de infecções por MRSA, os fatores associados incluem história de colonização por MRSA, hospitalização prolongada e/ou cirurgia prévia, internação em UTI, terapia antimicrobiana prévia, hemodiálise, diabetes mellitus, câncer, entre outros (Huang; Datta; Platt, 2006; Lakhundi; Zhang, 2018).

Desde meados da década de 1990, houve um aumento no número de infecções por MRSA relatadas em populações que não estavam expostas aos fatores de risco hospitalares. Estes isolados têm sido denominados MRSA associado à comunidade (*community-associated MRSA – CA-MRSA*) para diferenciar daqueles associados ao ambiente de assistência à saúde (*healthcare-associated MRSA – HA-MRSA*) (David; Daum, 2010).

Em 2005, nos EUA, foi criada uma definição padrão para CA-MRSA, determinando que uma cultura positiva para MRSA de qualquer parte do corpo de um paciente vindo da comunidade ou dentro de 48 horas de hospitalização classifica o isolado como CA-MRSA. Este paciente não deveria ter histórico de hospitalização, cirurgia ou residência em instituição de cuidados prolongados no último ano, diálise no último ano, nenhum cateter de demora no momento do isolamento e nenhuma cultura de MRSA positiva anterior, independentemente se for oriunda de colonização ou infecção (Buck *et al.*, 2005).

Com o decorrer do tempo, o aumento de infecções por CA-MRSA conduziu a sua disseminação em ambientes hospitalares. Acreditava-se que CA-MRSA substituiria HA-MRSA tradicionais nos hospitais (Patel *et al.*, 2008; Popovich; Weinstein; Hota, 2008; Seybold *et al.*, 2006). Isso acarretou grande preocupação, porque as graves infecções ocasionadas por isolados CA-MRSA, que têm por característica um grande potencial de virulência, ocorriam entre pacientes hospitalizados os quais apresentam uma série de comorbidades (D'Agata *et al.*, 2009; Popovich; Weinstein; Hota, 2008).

Definir um isolado como CA-MRSA pela ausência de fatores de risco para a exposição dos cuidados de saúde subestima enormemente a epidemiologia desta bactéria. Além disso, pode ser difícil determinar a origem da infecção por MRSA na comunidade, pois a colonização por MRSA persiste durante meses ou anos e pode não ser detectada, levando ao desenvolvimento de infecção meses e/ou anos após a alta hospitalar. Entretanto, a definição de

CA-MRSA, foi útil, inicialmente, para detectar a emergência desta bactéria. (David *et al.*, 2008; Lakhundi; Zhang, 2018).

Em geral, taxas de colonização nasal por MRSA geralmente são mais baixas na comunidade e tendem a aumentar no ambiente hospitalar (Faria *et al.*, 2014). Contudo, atualmente, isolados historicamente associados a infecções comunitárias podem ser identificados tanto no ambiente hospitalar quanto no ambiente comunitário, o que faz com que as classificações clínicas de CA-MRSA e HA-MRSA não sejam mais distintas, dificultando a sua diferenciação. (David *et al.*, 2008; Poulakou; Lagou; Tsiodras, 2019). Atualmente, definições epidemiológicas moleculares são consideradas as mais confiáveis (Wang *et al.*, 2010).

Isolados CA-MRSA são resistentes a um menor número de classes de antimicrobianos em comparação a HA-MRSA; também exibem um perfil característico quanto ao tipo de *SCCmec*. Na maioria das vezes, isolados HA-MRSA apresentam *SCCmec* tipos I, II ou III, enquanto os CA-MRSA geralmente contêm os tipos IV, V e VI. As diferenças não ficam restritas somente aos perfis de resistência, pois CA-MRSA apresentam maior virulência que HA-MRSA (CDC, 2013).

Outra população de MRSA tem despertado atenção, uma vez que os isolados se apresentam como sensíveis à oxacilina em testes fenotípicos, mas possuem o gene *mecA*. Este fenômeno foi relatado pela primeira vez por Kampf *et al.* (2003) em amostras obtidas da mucosa nasal de profissionais da saúde, onde foi denominado como MRSA dormente, ou seja, *S. aureus* sensível à oxacilina positivo para o gene *mecA*. Posteriormente, Hososaka *et al.* (2007), introduziram o termo *S. aureus* oxacilina-sensível *mecA*-positivo (*oxacillin-susceptible mecA-positive S. aureus* – OS-MRSA), o qual é usual até hoje. Estes autores sugeriram que estas bactérias seriam um novo tipo de MRSA e que estariam mais próximas de CA-MRSA, podendo até ser classificado como uma subclasse.

Isolados OS-MRSA têm sido crescentemente relatados em todo o mundo, não apenas entre os isolados comunitários e clínicos, mas também naqueles isolados de produtos alimentícios de origem animal (Andrade-Figueiredo; Leal-Balbino, 2016; Chen, Feng-jui *et al.*, 2012; Conceição *et al.*, 2015; Corrente *et al.*, 2007; He *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2017). Devido ao fenótipo de sensibilidade à oxacilina, isolados OS-MRSA podem ser erroneamente interpretados como *S. aureus* sensível a meticilina (*methicillin-susceptible S. aureus* – MSSA) por laboratórios clínicos de microbiologia de rotina, levando à falha terapêutica e até ao óbito caso o tratamento seja feito com oxacilina (Duarte *et al.*, 2019).

À medida que laboratórios clínicos passam a usar equipamentos automatizados para testes de sensibilidade antimicrobiana, há uma necessidade de avaliação cuidadosa do desempenho desses métodos para a detecção de OS-MRSA, visando impedir sua disseminação nos ambientes de cuidados à saúde e na comunidade (Chen, Feng-jui *et al.*, 2012).

Não existem dados que definam a terapia ideal para infecções por OS-MRSA. Dados *in vitro* mostram que tais isolados são heterorresistentes, com apenas 1 em 10^8 células ou menos expressando resistência de alto nível a oxacilina. Como o tamanho do inóculo utilizado em testes de sensibilidade é de ordem de grandeza mais baixa do que o número de isolados com resistência de alto nível, OS-MRSA podem não ser detectados como resistentes a este antimicrobiano. A incubação destes isolados heterorresistentes em níveis gradualmente mais elevados de β -lactâmicos pode originar subclones altamente resistentes (Sakoulas *et al.*, 2001). Por este motivo, em infecções onde OS-MRSA não são detectados o tratamento geralmente é feito com antibióticos β -lactâmicos, o que pode promover a seleção de isolados com resistência de alto nível, conduzindo à falha do tratamento (Song *et al.*, 2017).

Devido à resistência aos β -lactâmicos, o glicopeptídeo vancomicina é o fármaco de escolha para o tratamento de infecções causadas por MRSA. Entretanto, o primeiro relato de redução da sensibilidade a vancomicina em *S. aureus* foi reportado no Japão em 1997 e as cepas manifestavam dois fenótipos. O primeiro apresentava sensibilidade intermediária à vancomicina (*vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus* – VISA), com CIM de vancomicina de 8 $\mu\text{g/mL}$, já o segundo expressava heterorresistência à vancomicina (*heteroresistant vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus* – hVISA), com CIM de vancomicina de 4 $\mu\text{g/mL}$, tendo recebido as denominações de cepa Mu50 e Mu3, respectivamente (Hiramatsu, K. *et al.*, 1997; Hiramatsu, Keiichi, 1998). Os fenótipos VISA ou hVISA estão associados a um espessamento da parede celular devido a alterações na expressão de elementos genéticos reguladores (Pillai *et al.*, 2009).

A incorporação do cassete *vanA*, proveniente de *Enterococcus* spp., confere à *S. aureus* o fenótipo verdadeiramente resistente à vancomicina (*vancomycin-resistant Staphylococcus aureus* – VRSA), no qual a CIM é $\geq 16 \mu\text{g/mL}$. O primeiro caso de transferência do gene *van* para *S. aureus* foi identificado em junho de 2002 em Michigan nos EUA (Chang *et al.*, 2003). Desde então poucos casos foram reportados nos EUA (Walters *et al.*, 2015). Até hoje apenas um caso de aquisição do gene *vanA* por *S. aureus* no Brasil foi descrito, em 2012 em São Paulo, sendo a bactéria denominada de BR-VRSA (Rossi *et al.*, 2014).

A transmissão de *S. aureus* e MRSA entre profissionais de saúde pode indicar uma baixa adesão aos procedimentos de higienização das mãos, o uso não criterioso de antibióticos e

medidas ineficazes de vigilância e controle de infecção e colonização. De tal maneira que o controle cuidadoso destes aspectos são estratégias que podem prevenir e controlar a transmissão destes microrganismos em ambientes de saúde (Emaneini *et al.*, 2017).

1.5 OPERON *FEMXAB*

A resistência à meticilina em *Staphylococcus* spp. é atribuída à presença do gene cromossômico *mecA*, que codifica uma proteína de ligação à penicilina de baixa afinidade denominada PBP2' ou PBP2a (Reynolds; Fuller, 1986). A não correlação entre a quantidade real de PBP2a e o nível de resistência, entretanto, levou a estudos genéticos que, inicialmente, resultaram na descoberta inicial de seis fatores adicionais, denominados genes *fem* (*A*, *B*, *C*, *D*, *E* e *F*) ou fatores *aux*, que não estavam ligados ao locus *mec*, mas ainda assim influenciaram o nível de resistência a meticilina (Berger-Bächli, 1994, 1983; Berger-Bächli *et al.*, 1992; Labischinski, 1992). Atualmente, aproximadamente 30 genes *fem/aux* já foram identificados e a maioria são genes de manutenção, envolvidos em uma variedade de processos celulares e provavelmente presentes em todos os isolados de *S. aureus* (Monteiro *et al.*, 2019).

O gene cromossomal *femA* ocorre naturalmente em *S. aureus* e produz a proteína FemA de 48 KDa, que é fator essencial para a expressão da resistência à meticilina neste microrganismo. (Berger-Bächli, 1994; Maidhof *et al.*, 1991). A inativação de *femA* pela inserção do transposon Tn551 na região codificadora de *femA* converteu cepas resistentes em cepas sensíveis ou cepas já sensíveis em cepas hipersensíveis (Berger-Bächli, 1983; Berger-Bächli *et al.*, 1992; Labischinski, 1992; Maidhof *et al.*, 1991). A resistência original poderia ser restaurada pela introdução do plasmídeo pBBB31 com região *femA* integrada no mutante (Berger-Bächli *et al.*, 1989). O Tn551 é um transposon de 5,3 Kb, localizado no plasmídeo pI258 de *S. aureus*, onde reside o determinante da resistência a eritromicina (Khan; Novick, 1980; WU; DE LENCASTRE; TOMASZ, 1999).

Estudos bioquímicos revelaram que independentemente da presença do gene *mec*, a inativação de *femA* pelo Tn551 em *S. aureus* levou a alterações na composição do peptidoglicano da parede celular, ou seja, o conteúdo de glicina das suas pontes interpeptídicas (pontes de pentaglicina) foi reduzido (De Jonge *et al.*, 1993; Labischinski *et al.*, 1993; Maidhof *et al.*, 1991). Ainda segundo Maidhof *et al.* (1991), as cepas mutantes *femA* mostraram redução da renovação da parede celular em células em crescimento, redução da autólise de células completas em condições de não crescimento e maior sensibilidade à meticilina. Estes dados

sugerem que *femA* está envolvido na biossíntese da ponte interpeptídica de pentaglicina, que é característica do peptidoglicano de *S. aureus*.

A correlação entre uma quantidade intracelular reduzida da proteína FemA e um conteúdo diminuído de glicina na ponte pentaglicina do peptidoglicano forneceu a evidência de que a proteína desempenhou uma tarefa na transpeptidação da parede celular. Ainda que a mutação induzida em *femA* resulte na perda da resistência à meticilina, houve a incorporação residual de glicina no peptidoglicano, que ainda atingiu pelo menos 40% da quantidade encontrada nas cepas *femA* não mutadas. (Johnson, 1995; Maidhof *et al.*, 1991).

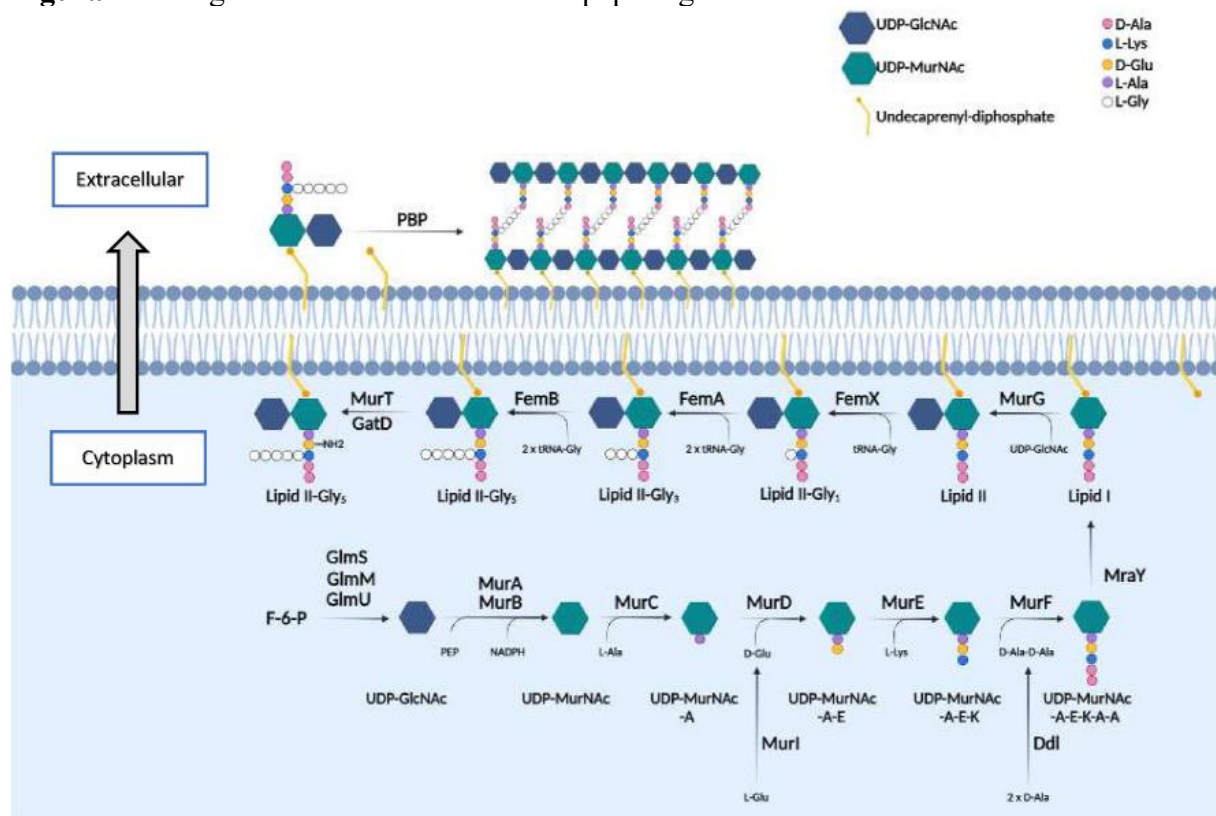
Adjacente a *femA* encontra-se outro gene, *femB*, que também afeta os níveis de resistência à meticilina, embora em menor grau do que a *femA* (Berger-Bächi *et al.*, 1989). Ao se analisar *femB* e a proteína produzida, denominada FemB de 52 KDa, foi demonstrado que inserções de Tn551 em *S. aureus* resistentes a meticilina também reduzem a resistência à meticilina, a renovação da parede celular e a autólise, semelhante à inativação de *femA*. Ou seja, mutações no operon *femAB* levaram a uma forte redução da expressão de FemA e FemB, de aproximadamente 90% (Berger-Bächi *et al.*, 1989, 1992; De Jonge; De Lencastre; Tomasz, 1991; Kornblum *et al.*, 1986; Maidhof *et al.*, 1991). Posteriormente, Kopp *et al.* (1996) relataram que na formação do peptidoglicano havia a participação de um gene adicional e sua proteína resultante, denominados *femX* e FemX de 51 KDa, respectivamente.

O peptidoglicano dos *S. aureus* possui pontes contendo cinco glicinas, que são sintetizadas pela família de proteínas FemXAB. Foi proposto que FemX adiciona a primeira glicina da ponte cruzada, enquanto FemA adiciona a segunda e a terceira e FemB adiciona a quarta e a quinta glicinas (Figura 2). Destes, o FemX foi considerado essencial, também foi demonstrado que ao contrário do que se pensava anteriormente, as células de *S. aureus* não sobrevivem na ausência de uma ponte cruzada de pentaglicina, entretanto, resíduos de glicina permitem a sobrevivência do microrganismo (Monteiro *et al.*, 2019; Rahman *et al.*, 2022; Strandén *et al.*, 1997).

A espinha dorsal do peptidoglicano é composta por unidades repetidas de ácido N-acetilmurâmico (MurNAc) e ácido N-acetilglucosamina (GlcNAc), onde uma haste pentapeptídica está ligada ao MurNAc. A biossíntese de peptidoglicano começa com a formação de um nucleotídeo precursor no citoplasma, que é posteriormente convertido em um precursor de peptidoglicano ligado a lipídios conhecido como Lipídeo-II. Os genes estafilocócicos essenciais para as proteínas Fem: FemX, FemA e FemB, adicionam resíduos de glicina sequencialmente à haste pentapeptídica do Lipídeo-II e desenvolvem a estrutura semelhante a uma malha do peptidoglicano. FemX adiciona a primeira glicina, FemA adiciona

a segunda e a terceira glicina e FemB adiciona a quarta e a quinta glicina à lisina da haste do pentapeptídeo A-E-K-A-A (A: L-alanina, E: D-glutamato, K: L-lisina, A-A: D-alanina-D-alanina). O pentapeptídeo Lipídeo-II modificado é então invertido através da membrana citoplasmática pelo complexo MurT/GatD e seguido pela reticulação de MurNAc mediada por proteínas de ligação à penicilina (PBPs). Os PBPs utilizam o pentapeptídeo Lipídeo-II modificado para desenvolver ligações cruzadas peptídicas por transpeptidação (Figura 2) (Berger-Bächli; Tschierske, 1998; Rohrer; Berger-Bächli, 2003; Sauvage *et al.*, 2008; Vollmer; Blanot; De Pedro, 2008).

Figura 2 - Estágios da via de biossíntese do peptidoglicano



As proteínas Mur citoplasmáticas sintetizam o pentapeptídeo UDP-MurNAc seguido pela adição de porções de glicina à lisina da haste do pentapeptídeo UDP-MurNAc. Mais tarde, o pentapeptídeo UDP-MurNAc é transportado para a membrana extracelular, onde as proteínas de ligação à penicilina utilizam o pentapeptídeo UDP-MurNAc e dão origem à cadeia peptidoglicana reticulada. Fonte: (Rahman *et al.*, 2022).

2 JUSTIFICATIVA

Considerando que *S. aureus* pode ser colonizador de pele e mucosas e viver em harmonia com os seres humanos, porém, em algumas situações se tornar patogênico e representar um risco à saúde, especialmente em indivíduos imunocomprometidos, hospitalizados ou em uso de dispositivos médicos invasivos como catéteres, sondas e tubos orotraqueais. Considerando também que *S. aureus* é um importante patógeno comunitário e hospitalar, responsável por elevadas taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, causador de uma grande variedade de infecções, sendo a respiratória e de corrente sanguínea preocupantes devido ao mau prognóstico, podendo rapidamente evoluir para sepse e óbito.

A resistência aos antimicrobianos, em especial isolados MRSA é cada vez mais preocupante, especialmente nos últimos anos, com a identificação de um novo tipo de resistência chamada OS- MRSA, que pode apresentar um resultado sensível a oxacilina em testes laboratoriais, mas *in-vivo*, exibir resistência a este fármaco frente a pressão seletiva do tratamento, podendo ser potencialmente fatal. Os isolados OS-MRSA exibem considerável diversidade genética, com variações nos fatores de virulência e determinantes de resistência. Considerando a epidemiologia global, os crescentes relatos de OS-MRSA e a grande variabilidade genética, faz-se necessário estudar e compreender melhor os padrões genéticos de *S. aureus*, estudando mecanismos de virulência e de resistência a oxacilina.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os mecanismos gênicos relacionados à resistência tipo OS-MRSA

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) escrever uma revisão integrativa
- b) realizar a tipagem *SCCmec*;
- c) sequenciar o genoma total de isolado clínico de *S. aureus*;
- d) realizar a análise aprofundada do genoma;
- e) avaliar o alinhamento dos genes *femXAB*.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO

A amostra foi coletada no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (HU-UEL), um hospital terciário, centro de referência para o SUS na região norte do estado do Paraná, Brasil. Atende pacientes de aproximadamente 250 municípios do Paraná e de mais de 100 cidades de outros estados. Possui 431 leitos distribuídos entre unidades de internação, pronto socorro e unidade de terapia intensiva (UTI) (PDI-UEL, 2024).

Os testes descritos nesse trabalho foram realizados no setor de microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LAC) do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (HU-UEL), no laboratório de biologia molecular de microrganismos (NIP5) localizado no Centro de Ciências Biológicas (CCB) no campus da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e no Laboratório de Resistoma, Viruloma e Alternativas Terapêuticas do Departamento de Análises Clínicas, Escola de Farmácia da Universidade de São Paulo (USP).

4.2 DELINEAMENTO

Trata-se de um estudo, transversal, descritivo e observacional de culturas de *S. aureus* isolados de pacientes internados em um hospital do Sul do Brasil, de janeiro de 2016 a dezembro de 2023.

O estudo foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina (CEP/ UEL), tendo sido aprovado em 22 de junho de 2021, sob o parecer: 4.796.146.

Foi incluída no estudo *S. aureus* proveniente de amostra clínica que apresentou sensibilidade a oxacilina em testes laboratoriais usuais, porém, possuíam o gene *mecA*, que é marcador para a resistência a oxacilina. Vários isolados foram selecionados para o sequenciamento, entretanto, para este estudo apenas um isolado causador de sepse fatal foi considerado devido à sua importância e pelos estudos previamente realizados por este grupo de pesquisa (Duarte *et al.*, 2019). Os demais isolados serão avaliados em trabalhos futuros.

4.3 MÉTODOS FENOTÍPICOS

4.3.1 Identificação de *Staphylococcus aureus* e Avaliação da Sensibilidade aos Antimicrobianos

Os isolados foram identificados utilizando metodologia Manual, de acordo com Jorgensen *et al.* (2015) e automatizada, utilizando o sistema Vitek[®] 2 Compact (bioMérieux-USA) e na sequência os isolados foram estocados a -80°C em meio TSB contendo 30% de glicerol até o momento das análises moleculares.

4.4 MÉTODOS GENOTÍPICOS

4.4.1 Extração de DNA

A extração do DNA genômico foi realizada conforme descrito por Ausubel *et al.* (1999). De maneira que, uma alíquota de 30 µL retirada do estoque foi transferida para 3 mL de TSB e incubado a 35°C por 24 h. As células foram colhidas por centrifugação a 10.000 x g durante 3 minutos e ressuspensas em 500 µL de tampão TENTS. Na sequência, foram adicionados 400 µL de fenol (tamponado com 10 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA, pH 8,0) e duas pérolas de vidro à suspensão. Cada tubo foi submetido a três ciclos de 1 minuto no agitador *vortex* e 1 minuto no gelo. Após, foi realizada centrifugação a 10.000 x g durante 10 minutos e transferidos 400 µL da fase aquosa (sobrenadante) para um tubo novo, no qual foram adicionados 300 µL de solução contendo clorofórmio/álcool isoamílico (24/1), sendo homogeneizado manualmente por inversão e posteriormente centrifugado a 10.000 x g durante 10 minutos. Após centrifugação, foram transferidos 300 µL da fase aquosa (sobrenadante) para um tubo novo, no qual foram adicionados 2,5 volumes de etanol absoluto gelado. O tubo foi armazenado a -20°C por no mínimo 2 horas, sendo centrifugado (10.000 x g durante 10 minutos) após este período e descartado o sobrenadante. Ao *pelet* formado foi adicionado, cuidadosamente para não ressuspendê-lo, 1 mL de etanol 70% e novamente centrifugado a 10.000 x g durante 10 minutos, sendo descartado o sobrenadante. O DNA foi ressuspendido em 30 µL de água ultrapura.

Também foi utilizada uma segunda técnica de extração para o sequenciamento genômico, onde, o DNA total foi capturado utilizando kit comercial da Sigma Aldrich GenElute TM 2010, seguindo as recomendações de fabricação.

4.4.2 PCR Convencional

Como teste confirmatório para a identificação da espécie foi utilizado gene codificante da coagulase (gene *coa*) de acordo com Tiwari, Sapkota e Sen (2008) e gene codificante de termonuclease (gene *nuc*) de acordo com Hirotaki et al. (2011). A detecção do gene *mecA* e a tipificação dos elementos SCC*mec* foram realizadas de acordo com metodologia proposta por Milheiriço, Oliveira e Lencastre (2007). A resistência a oxacilina foi avaliada de acordo com a presença do gene *mecA*.

4.4.3 Sequenciamento do Genoma

Uma vez obtido e avaliado o DNA total, o material genético foi submetido ao sequenciamento na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa-soja, unidade de Londrina, na plataforma MiSeq (Illumina) utilizando o kit MiSeq Reagent v3 (600 ciclos) na estratégia paired-end 2x300. Após o sequenciamento a qualidade das leituras foi avaliada utilizando a ferramenta FastQC (*Fast Quality Control*) para determinação do Índice de Qualidade Phred (Q). Todos os contigs construídos seguem os parâmetros padrão da plataforma computacional Genomics Workbench CLC versão 10 (CLC bio, Dinamarca – QIAGEN Bioinformatics). A anotação foi feita utilizando o algoritmo de grafos Bruijn disponível na plataforma CLC bio. O arquivo com as sequências construídas foi submetido para alinhamento de sequências utilizando ferramentas BLASTx. Todos os dados gerados foram introduzidos no aplicativo Blast2GO, com *contigs* próprios. O mapeamento de sequências com alinhamento significativo foi obtido utilizando a base de dados Gene Ontology. Para determinar a anotação funcional as análises foram submetidas em bases de dados KEGG para determinar as possíveis vias metabólicas associadas aos códigos enzimáticos. Após toda montagem e anotação funcional dos genes foi realizada uma varredura para identificar genes que codificam componentes causadores de resistência antimicrobiana e virulência bacteriana.

4.4.4 Número de Acesso ao GenBank

Todo este projeto de Genoma Shotgun para a cepa 549 de *S. aureus* foi depositado em DDBJ/ENA/GenBank sob o acesso PGGL00000000. A versão descrita neste artigo é a versão PGGL01000000. ID do BioProjeto PRJNA416852 e BioSample SAMN07967050.

4.4.5 Análise Genômica Ampliada

O genoma foi anotado com Prokka v1.x (<https://github.com/tseemann/prokka>) (Seemann, 2014). Para *Multilocus Sequence Typing* (MLST) a identificação do cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*), *spa* type, presença de plasmídeos, predição de genes de resistência antimicrobiana e genes de virulência foram realizadas utilizando as ferramentas SpeciesFinder 2.0, MLST 2.0, SCC*mec*Finder 1.2, spaTyper 1.0, PlasmidFinder 2.1, ResFinder 3.2, VirulenceFinder 2.0 respectivamente, disponíveis no site do CGE (*Center for Genomic Epidemiology*) (<https://www.genomicepidemiology.org/services/>) (Camacho *et al.*, 2009; Carattoli; Hasman, 2020; Larsen *et al.*, 2012; Zankari *et al.*, 2012). Além disso, ABricate v0.9.8 (<https://github.com/tseemann/abricate>) foi usado com o banco de dados de fatores de virulência (Chen, Lihong *et al.*, 2016) para prever genes de virulência. O banco de dados abrangente de resistência a antibióticos (<https://card.mcmaster.ca/home>) para predição de genes de resistência. Para todos os genes, foram utilizados valores superiores a 95% para cobertura e identidade.

Como os genes *mecA* e *femXAB* são considerados essenciais para a resistência à meticilina (Giannouli *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2022; Monteiro *et al.*, 2019), rastreamos esses genes para mutações no genoma da cepa *S. aureus* 549 *mecA*-positivo sensível a oxacilina. Além disso, mutações na região promotora (região a montante de 35 pb do local de início da tradução de *mecA*) podem afetar a resistência à cefoxitina/oxacilina (Liang *et al.*, 2022). Desta forma, a sequência para o gene *mecA* (2007 pb) e região a montante de 65 pb do local de início da tradução de *mecA*, genes *femA* (1263 pb), *femB* (1260 pb) e *femX* (codifica para o FemX), obtida da sequência completa do genoma da cepa de *S. aureus* 549, foram alinhadas às sequências da cepa de MRSA SQW1 (número de acesso do GenBank: CP045468.1) (Giannouli *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2022; Monteiro *et al.*, 2019), usando GeniousPrime 8.

5 RESULTADOS

Serão apresentados em dois artigos:

ARTIGO 1 – OS-MRSA ISOLATES AS A CAUSE OF MAJOR CLINICAL DIFFICULTY: DIAGNOSTIC AND TREATMENT DIFFICULTIES

ARTIGO 2 – MUTAÇÃO EM *FEMX* E *FEMÁ* E SUA RELAÇÃO COM *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SENSÍVEL A OXACILINA *MECA* POSITIVO (OS-MRSA)

ARTIGO 1 – OS-MRSA ISOLATES AS A CAUSE OF MAJOR CLINICAL DIFFICULTY: DIAGNOSTIC AND TREATMENT DIFFICULTIES

ABSTRACT

Staphylococcus aureus are microorganisms responsible for causing various infectious processes. They can be simple infections restricted to the skin, or deep and invasive infections, such as bloodstream infections. The emergence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *S. aureus* isolates (OS-MRSA) has imposed difficulties in the treatment of patients with staphylococcal infection, as such isolates can be erroneously detected as susceptible and lead to failure in the therapy employed.

Keywords: *Staphylococcus aureus*. Epidemiology. OS-MRSA infections. Drug-resistance.

Staphylococcus aureus has the ability to cause various infectious processes, from superficial sites to deep or systemic infections, such as bacteremia. Since its discovery in the 1960s, methicillin -resistant *S. aureus* (MRSA) has gained great clinical significance, whether due to its rapid spread, both in community and hospital environments, or due to the mechanisms of resistance and virulence inherent to the pathogen, which confer difficulty in treating patients affected by these isolates, generating mortality rates that can reach up to 60% (Mahjabeen *et al.*, 2022).

With the development of resistance to penicillin (1940s) and, later, methicillin, in the mid-1960s, studies have demonstrated the resistance mechanisms exhibited by MRSA isolates (Ahmad-Mansour *et al.*, 2021; Dyke, 1969). Methicillin resistance occurs through the expression of the *mecA* gene, located in a mobile genetic element called the Staphylococcal Chromosomal Cassette (SCC). This gene is responsible for the production of a modified protein called Penicillin Binding Protein (PBP), PBP2a, which exhibits low affinity to beta-lactam drugs, thus making isolates resistant to treatment with this class of antimicrobial (Chen, Hongbin *et al.*, 2021; Mlynarczyk-Bonikowska *et al.*, 2022; Shoaib *et al.*, 2023).

Methicillin resistance used to be reported only by evaluating the minimum inhibitory concentration (MIC) values for oxacillin. Isolates with MIC values $\geq 4\mu\text{g}/\text{mL}$ were considered to be MRSA, and those isolates with MIC $\leq 2\mu\text{g}/\text{mL}$ would be classified as Methicillin -Sensible *S. aureus* (MSSA) (Boonsiri *et al.*, 2020). However, in another studies a type of *S. aureus* classified as “dormant” MRSA was described. This isolate, although *in vitro* susceptible to methicillin, contained the *mecA* gene, which induces resistance to beta-lactam drugs. These isolates, when coming into contact with antimicrobials, could reverse their susceptibility, which

would lead to therapy failure and a worse clinical outcome. Thus, the term oxacillin-susceptible *mecA*-positive *S. aureus* appeared (OS-MRSA) (Murakami *et al.*, 1991; Pournaras *et al.*, 2015).

Since then, studies have reported the presence of OS-MRSA isolates around the world, but their prevalence is extremely variable. A series of factors are involved in its epidemiology, such as: difficulty in laboratory phenotypic identification, isolates originating from the community or health-promoting environment and the variety of infectious sites from which the isolates are captured. Thus, studies indicate the epidemiology of OS-MRSA varies between 1.25 and 52% (Andrade-Figueiredo; Leal-Balbino, 2016; Duarte *et al.*, 2019; Hososaka *et al.*, 2007; Liu, Jun-Lan *et al.*, 2021).

OS-MRSA isolates shows a high epidemiological diversity. It is possible to understand this fact, among OS-MRSA, by a literature review. Among the studies evaluated by the authors, there was a variation between 1.6%, in a study conducted with healthcare workers, and 11% in another study carried out with patients admitted to a Greek hospital. In another study, conducted in nine Chinese cities, with 1588 isolates from different sites, the highest prevalences were detected in the cities of Guangzhou (30%); in Beijing (18.3%); in Wuhan (15.1%) and Hangzhou (13.3%) (He *et al.*, 2013; Ma, Mingbiao *et al.*, 2021).

In addition to their variable epidemiology, and the diversity of sites that OS-MRSA isolates can affect, these isolates can also be found colonizing healthy patients. This fact becomes even more relevant when these asymptomatic carriers are healthcare professionals, which can favor transmission to patients hospitalized in healthcare services and complicate the therapy to be used (Danelli *et al.*, 2020).

Although the resistance mechanism of MRSA isolates is well elucidated, this fact is still unknown regarding OS-MRSA. Some authors suggested that there is a suggestion of mutations in the *femXAB* gene family, which participates in the synthesis of the microorganism's wall (Brahma *et al.*, 2019; Giannouli *et al.*, 2010).

Another point raised, in an attempt to explain this phenomenon, is the decrease in the regulation of the expression of genes responsible for bacterial wall synthesis, as well as changes in the sequences of the *mecI* and *mecR* genes, which regulate and express *mecA*. Changes in the expression of genes such as: *rpoB*, *femXAB* susceptibility pattern when coming into contact with beta lactam antimicrobials. Furthermore, changes in genes responsible for bacterial wall synthesis explain the fact that such microorganisms, in culture media, present smaller-sized colonies, compared to standard MRSA colonies (Boonsiri *et al.*, 2020; Liang *et al.*, 2022).

Given the enormous epidemiological diversity and multiple mechanisms of virulence and resistance, the treatment of patients with *S. aureus* infection has been a clinical challenge

(Duarte *et al.*, 2019; Hou *et al.*, 2023). This fact becomes even more relevant when it comes to OS-MRSA isolates. Following what is described in stewardship, as well as efficient antimicrobial management protocols, clinicians tend to optimize the therapy used, based on laboratory identification. However, these microorganisms are falsely classified as susceptible in phenotypic tests by the clinical laboratory. Another relevant point is the possibility of reversing susceptibility when starting therapy with beta-lactams, which can cause failure in the therapy used and lead to a worse clinical prognosis (Liu, Roushan *et al.*, 2021).

Considering the particularities of the pathogen, it is necessary that the treatment for patients infected by OS-MRSA isolates is as effective as possible to resolve the condition. Anti-staphylococcal penicillin's, such as oxacillin, due to resistance phenomena, should be used with caution, with vancomycin being one of the therapies of choice for the treatment of MRSA infections (Giannella *et al.*, 2020).

Another point to be considered is the intensification of therapy with the use of combinations of antimicrobials, which according to the authors has demonstrated benefit, both in reducing poor prognoses and in effective resolution from the board. The use of ceftaroline, a fifth-generation anti-MRSA cephalosporin, appears to show promising results in the treatment of infections complicated by MRSA/OS-MRSA. Furthermore, its use in combination with daptomycin appears to improve the host response and reduce bacterial virulence (Heger; Al-Sayyad, 2022)(Holland; Bayer; Fowler, 2022).

OS-MRSA isolates generate great clinical difficulty, whether for correct laboratory identification or for ideal therapeutic management. More studies on the topic are necessary so that, in fact, the real mechanism of resistance involved in the situation is known, as well as knowledge of epidemiology, both local and global.

REFERENCES

AHMAD-MANSOUR, Nour; LOUBET, Paul; POUGET, Cassandra; DUNYACH-REMY, Catherine; SOTTO, Albert; LAVIGNE, Jean-Philippe; MOLLE, Virginie. *Staphylococcus aureus* Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments. **Toxins**, vol. 13, no. 10, p. 677, 23 Sep. 2021. <https://doi.org/10.3390/toxins13100677>.

ANDRADE-FIGUEIREDO, Mariana; LEAL-BALBINO, Tereza Cristina. Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil. **BMC Microbiology**, vol. 16, no. 1, p. 115, 21 Dec. 2016. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0733-4>.

BOONSIRI, Tanit; WATANABE, Shinya; TAN, Xin-Ee; THITIANANPAKORN, Kanate; NARIMATSU, Ryu; SASAKI, Kosuke; TAKENOUCHI, Remi; SATO'O, Yusuke; AIBA, Yoshifumi; KIGA, Kotaro; SASAHARA, Teppei; TAKI, Yusuke; LI, Feng-Yu; ZHANG, Yuancheng; AZAM, Aa Haeruman; KAWAGUCHI, Tomofumi; CUI, Longzhu.

Identification and characterization of mutations responsible for the β -lactam resistance in oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*. **Scientific Reports**, vol. 10, no. 1, p. 16907, 9 Oct. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73796-5>.

BRAHMA, Umarani; SHARMA, Paresh; MURTHY, Shweta; SHARMA, Savitri; CHAKRABORTY, Shalini; APPALARAJU, Sundarapu Naga; BHANDARI, Vasundhra. Decreased expression of *femXAB* genes and fnbp mediated biofilm pathways in OS-MRSA clinical isolates. **Scientific Reports**, vol. 9, no. 1, p. 16028, 5 Nov. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52557-z>.

CHEN, Hongbin; YIN, Yuyao; VAN DORP, Lucy; SHAW, Liam P.; GAO, Hua; ACMAN, Mislav; YUAN, Jizhen; CHEN, Fengning; SUN, Shijun; WANG, Xiaojuan; LI, Shuguang; ZHANG, Yawei; FARRER, Rhys A.; WANG, Hui; BALLOUX, Francois. Drivers of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) lineage replacement in China. **Genome Medicine**, vol. 13, no. 1, p. 171, 28 Dec. 2021. <https://doi.org/10.1186/s13073-021-00992-x>.

DANELLI, Tiago; DUARTE, Felipe Crepaldi; OLIVEIRA, Thilara Alessandra de; SILVA, Raquel Soares da; FRIZON ALFIERI, Daniela; GONÇALVES, Guilherme Bartolomeu; OLIVEIRA, Caio Ferreira de; TAVARES, Eliandro Reis; YAMAUCHI, Lucy Megumi; PERUGINI, Marcia Regina Eches; YAMADA-OGATTA, Sueli Fumie. Nasal Carriage by *Staphylococcus aureus* among Healthcare Workers and Students Attending a University Hospital in Southern Brazil: Prevalence, Phenotypic, and Molecular Characteristics. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, vol. 2020, p. 1–11, 3 Dec. 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/3808036>.

DUARTE, Felipe Crepaldi; DANELLI, Tiago; TAVARES, Eliandro Reis; MORGUETTE, Ana Elisa Belotto; KERBAUY, Gilselena; GRION, Cintia Magalhães Carvalho; YAMAUCHI, Lucy Megumi; PERUGINI, Marcia Regina Eches; YAMADA-OGATTA, Sueli Fumie. Fatal sepsis caused by *mecA*-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: First report in a tertiary hospital of southern Brazil. **Journal of Infection and Chemotherapy**, vol. 25, no. 4, p. 293–297, Apr. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2018.09.010>.

DYKE, K. G. H. Penicillinase production and intrinsic resistance to penicillins in methicillin-resistant cultures of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, vol. 2, no. 3, p. 261–278, 1 Aug. 1969. <https://doi.org/10.1099/00222615-2-3-261>.

GIANNELLA, M.; BARTOLETTI, M.; GATTI, M.; VIALE, P. Advances in the therapy of bacterial bloodstream infections. **Clinical Microbiology and Infection**, vol. 26, no. 2, p. 158–167, Feb. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.11.001>.

GIANNOULI, Stamatina; LABROU, Maria; KYRITSIS, Athanassios; IKONOMIDIS, Alexandros; POURNARAS, Spyros; STATHOPOULOS, Constantinos; TSAKRIS, Athanassios. Detection of mutations in the FemXAB protein family in oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 65, no. 4, p. 626–633, 1 Apr. 2010. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq039>.

HE, Wenqiang; CHEN, Hongbin; ZHAO, Chunjiang; ZHANG, Feifei; WANG, Hui. Prevalence and molecular typing of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* from multiple hospitals in China. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, vol. 77, no. 3, p. 267–269, Aug. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.07.001>.

HEGER, Margaret L.; AL-SAYYAD, Ban. Ceftaroline and Daptomycin Combination Antibiotic Therapy for a Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Liver Abscess in a Premature Infant. **The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics**, vol. 27, no. 8, p. 754–759, 1 Dec. 2022. <https://doi.org/10.5863/1551-6776-27.8.754>.

HOLLAND, Thomas L; BAYER, Arnold S; FOWLER, Vance G. Persistent methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia: Resetting the Clock for Optimal Management. **Clinical Infectious Diseases**, vol. 75, no. 9, p. 1668–1674, 29 Oct. 2022. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac364>.

HOSOSAKA, Yasuko; HANAKI, Hideaki; ENDO, Harumi; SUZUKI, Yumiko; NAKAE, Taiji; NAGASAWA, Zenzo; OTSUKA, Yoshihito; SUNAKAWA, Keisuke. Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. **Journal of Infection and Chemotherapy**, vol. 13, no. 2, p. 79–86, Apr. 2007. <https://doi.org/10.1007/s10156-006-0502-7>.

HOU, Zhuru; LIU, Ling; WEI, Jianhong; XU, Benjin. Progress in the Prevalence, Classification and Drug Resistance Mechanisms of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Infection and Drug Resistance**, vol. Volume 16, p. 3271–3292, May 2023. <https://doi.org/10.2147/IDR.S412308>.

LIANG, Bingshao; XIONG, Zhile; LIANG, Zhuwei; ZHANG, Chao; CAI, Hao; LONG, Yan; GAO, Fei; WANG, Jielin; DENG, Qiulian; ZHONG, Huamin; XIE, Yongqiang; HUANG, Lianfen; GONG, Sitang; ZHOU, Zhenwen. Genomic Basis of Occurrence of Cryptic Resistance among Oxacillin- and Cefoxitin-Susceptible *mecA* -Positive *Staphylococcus aureus*. **Microbiology Spectrum**, vol. 10, no. 3, 29 Jun. 2022. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00291-22>.

LIU, Jun-Lan; LI, Tian-Ming; ZHONG, Ni; WANG, Xing; JIANG, Jie; ZHANG, Wen-Xia; TANG, Rong; GUO, Yin-Juan; LIU, Yun; HU, Jiang; HE, Li-Hua; TANG, Jin; WU, Wen-Juan; LI, Min. Current status of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* infection in Shanghai, China: A multicenter study. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, vol. 54, no. 6, p. 1070–1077, Dec. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.07.021>.

LIU, Roushan; ZHANG, Jian; DU, Xiaoli; LV, Yingying; GAO, Xiangyu; WANG, Yanyan; WANG, Junrui. Clonal Diversity, Low-Level and Heterogeneous Oxacillin Resistance of Oxacillin Sensitive MRSA. **Infection and Drug Resistance**, vol. Volume 14, p. 661–669, Feb. 2021. <https://doi.org/10.2147/IDR.S288991>.

MA, Mingbiao; CHU, Minjun; TAO, Lvyan; LI, Jue; LI, Xiaojuan; HUANG, Hailin; QU, Kexuan; WANG, Haiping; LI, Li; DU, Tingyi. First Report of Oxacillin Susceptible *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* in a Children's Hospital in Kunming, China. **Infection and Drug Resistance**, vol. Volume 14, p. 2597–2606, Jul. 2021. <https://doi.org/10.2147/IDR.S317670>.

MAHJABEEN, Fatema; SAHA, Utsow; MOSTAFA, Mayesha N; SIDDIQUE, Farzana; AHSAN, Eram; FATHMA, Sawsan; TASNIM, Anika; RAHMAN, Tasnim; FARUQ, Ridwan; SAKIBUZZAMAN, Md; DILNAZ, Fahmida; ASHRAF, Adrita. An Update on Treatment Options for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Bacteremia: A Systematic Review. **Cureus**, 14 Nov. 2022. <https://doi.org/10.7759/cureus.31486>.

MLYNARCZYK-BONIKOWSKA, Beata; KOWALEWSKI, Cezary; KROLAK-ULINSKA, Aneta; MARUSZA, Wojciech. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 23, no. 15, p. 8088, 22 Jul. 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23158088>.

MURAKAMI, K; MINAMIDE, W; WADA, K; NAKAMURA, E; TERAOKA, H; WATANABE, S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 29, no. 10, p. 2240–2244, Oct. 1991. <https://doi.org/10.1128/jcm.29.10.2240-2244.1991>.

POURNARAS, Spyros; SABAT, Artur; GRUNDMANN, Hajo; HENDRIX, Ron; TSAKRIS, Athanasios; FRIEDRICH, Alexander. Driving Forces of Mechanisms Regulating Oxacillin-Resistance Phenotypes of MRSA: Truly Oxacillin-Susceptible *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates also Exist. **Current Pharmaceutical Design**, vol. 21, no. 16, p. 2048–2053, 27 Apr. 2015. <https://doi.org/10.2174/1381612821666150310103754>.

SHOAIB, Muhammad; AQIB, Amjad Islam; MUZAMMIL, Iqra; MAJEED, Noreen; BHUTTA, Zeeshan Ahmad; KULYAR, Muhammad Fakhar-e-Alam; FATIMA, Mahreen; ZAHEER, C-Neen Fatima; MUNEEB, Afshan; MURTAZA, Maheen; KASHIF, Muhammad; SHAFQAT, Furqan; PU, Wanxia. MRSA compendium of epidemiology, transmission, pathophysiology, treatment, and prevention within one health framework. **Frontiers in Microbiology**, vol. 13, 10 Jan. 2023. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1067284>.

ARTIGO 2 – MUTAÇÃO EM *FEMX* E *FEMA* E SUA RELAÇÃO COM *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SENSÍVEL A OXACILINA *MECA* POSITIVO (OS-MRSA)

RESUMO

Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA) é um microrganismo que apresenta grande variabilidade genética e tem ocorrência mundial. Através da análise do genoma completo de *S. aureus* 549, isolado de infecção de corrente sanguínea de paciente com choque séptico, foi possível evidenciar que esta cepa, embora tenha se mostrado sensível à meticilina, portava o gene *mecA*, sendo resistente aos β -lactâmicos e classificada como sensível a oxacilina *mecA*-positivo (OS-MRSA). Também foram identificadas mutações em *femX* (I51V) e *femA* (Q36E e Y195F), genes relacionados com a formação do peptidoglicano. Mutações em *femX* sugerem fortemente que a cepa 549 OS-MRSA também poderia ter a expressão de *femX* diminuída. Mutações em *femA* podem estar associadas a OS-MRSA ou à restauração da sensibilidade a oxacilina em MRSA. Pesquisas focadas em fatores adjacentes a *mecA* podem revelar possíveis alvos farmacológicos, como as proteínas resultantes dos genes *fem*.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*. Infecções OS-MRSA. Antimicrobianos. Genoma.

INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA) é um microrganismo que apresenta grande variabilidade genética e tem ocorrência mundial (Hisatsune *et al.*, 2017). Foi descrito pela primeira vez em pacientes hospitalares, porém, hoje também podemos relacioná-los às infecções comunitárias (Hau *et al.*, 2017).

Isolados de *S. aureus*, frequentemente associados a processos infecciosos, apresentam alto potencial para se tornarem resistentes a agentes antimicrobianos (Lin; Koskella; Lin, 2017; Lindsay; Holden, 2004). Mundialmente, tem havido um aumento na ocorrência deste microrganismo multirresistente (*Multidrug resistance* – MDR). A infecção por *S. aureus* representa um mau prognóstico, podendo apresentar dificuldades de tratamento (Ochieng’ Oduor *et al.*, 2016). De acordo com Boucher *et al.* (2009), na América do Norte as mortes hospitalares ocasionadas por MRSA tiveram maiores proporções do que aquelas causadas por HIV e Tuberculose juntas.

O gene cromossômico *mecA* atribui a resistência a meticilina em *Staphylococcus spp.* através da codificação de uma proteína de ligação à penicilina de baixa afinidade denominada PBP2a ou PBP2’ (Reynolds; Fuller, 1986). A não correlação entre a quantidade real de PBP2a e o nível de resistência, entretanto, levou a estudos genéticos que, inicialmente, resultaram na descoberta inicial de seis fatores adicionais, denominados genes *fem* (*A*, *B*, *C*, *D*, *E* e *F*), que

não estavam ligados ao locus *mec*, mas ainda assim influenciaram o nível de resistência a meticilina (Berger-Bächli, 1994, 1983; Berger-Bächli *et al.*, 1992; Labischinski, 1992).

O peptidoglicano dos *S. aureus* possui pontes contendo cinco glicinas, que são sintetizadas pela família de proteínas FemXAB expressas a partir dos genes *femXAB*. Foi proposto que FemX adiciona a primeira glicina da ponte cruzada, enquanto FemA adiciona a segunda e a terceira e FemB adiciona a quarta e a quinta glicinas. Também foi demonstrado que ao contrário do que se pensava anteriormente, as células de *S. aureus* não sobrevivem na ausência de uma ponte cruzada de pentaglicina, entretanto, resíduos de glicina permitem a sobrevivência do microrganismo (Monteiro *et al.*, 2019; Rahman *et al.*, 2022; Strandén *et al.*, 1997).

Neste trabalho mostramos o sequenciamento genômico, realizado pelo nosso grupo de estudos, de uma cepa de *S. aureus* que causou choque séptico em um paciente de 43 anos de um Hospital Terciário do Sul do Brasil. Esta cepa pertence ao Complexo Clonal 1 (CC1) e possui Sequência Tipo 1 (ST 1) (Duarte *et al.*, 2019). Após revisão genômica, evidenciamos que apesar de ser fenotipicamente sensível a meticilina, esta cepa portava o gene *mecA*, o qual gerou falha terapêutica para os agentes β -lactâmicos com posterior sepse fatal (Duarte *et al.*, 2019). Portanto, sendo classificada como *S. aureus* sensível a oxacilina *mecA* positivo (OS-MRSA) (Chung *et al.*, 2016).

Microrganismos que possuem genes relacionados com resistência antimicrobiana, mas que em testes fenotípicos usuais são sensíveis a estes mesmos antimicrobianos, são especialmente preocupantes e devem ser melhor estudados. Apesar da aparente sensibilidade fenotípica, o microrganismo possui capacidade gênica para expressar a resistência e gerar uma falha terapêutica (Duarte *et al.*, 2019). Tendo conhecimento deste fato, nosso grupo de pesquisa busca, através deste trabalho, melhor compreender os mecanismos gênicos relacionados à resistência tipo OS-MRSA através da análise das sequências dos genes *femXAB*.

MÉTODOS

Extração de DNA

S. aureus previamente isolado em 2016 de um caso de infecção de corrente sanguínea, foi armazenado em laboratório de análises clínicas a -80 °C. O isolado foi descongelado e cultivado em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) a 37 °C, por 24 horas. Após o cultivo inicial, foi confirmada a pureza do isolado e novamente cultivado em caldo BHI a 37 °C, por 24 horas,

sob agitação de 200 rpm. Este segundo cultivo foi usado para obter DNA total. Após o crescimento bacteriano, conforme descrito acima, o DNA total foi extraído utilizando kit comercial da Sigma Aldrich GenElute TM 2010, seguindo as recomendações do fabricante.

Sequenciamento genômico

Uma vez obtido e avaliado o DNA total, o material genético foi submetido ao sequenciamento na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa-soja, unidade de Londrina, na plataforma MiSeq (Illumina) utilizando o kit MiSeq Reagent v3 (600 ciclos) na estratégia paired-end 2x300. Após o sequenciamento a qualidade das leituras foi avaliada utilizando a ferramenta FastQC (*Fast Quality Control*) para determinação do Índice de Qualidade Phred (Q). Todos os contigs construídos seguem os parâmetros padrão da plataforma computacional Genomics Workbench CLC versão 10 (CLC bio, Dinamarca – QIAGEN Bioinformatics). A anotação foi feita utilizando o algoritmo de grafos Bruijn disponível na plataforma CLC bio. O arquivo com as sequências construídas foi submetido para alinhamento de sequências utilizando ferramentas BLASTx. Todos os dados gerados foram introduzidos no aplicativo Blast2GO, com *contigs* próprios. O mapeamento de sequências com alinhamento significativo foi obtido utilizando a base de dados Gene Ontology. Para determinar a anotação funcional as análises foram submetidas em bases de dados KEGG para determinar as possíveis vias metabólicas associadas aos códigos enzimáticos. Após toda montagem e anotação funcional dos genes foi realizada uma varredura para identificar genes que codificam componentes causadores de resistência antimicrobiana e virulência bacteriana.

Número de acesso ao GenBank

Todo este projeto de Genoma Shotgun para a cepa 549 de *S. aureus* foi depositado em DDBJ/ENA/GenBank sob o acesso PGGL00000000. A versão descrita neste artigo é a versão PGGL01000000. ID do BioProjeto PRJNA416852 e BioSample SAMN07967050.

Análise genômica aprofundada

O genoma foi anotado com Prokka v1.x (<https://github.com/tseemann/prokka>) (Seemann, 2014). Para *Multilocus Sequence Typing* (MLST) a identificação do cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*), *spa* type, presença de plasmídeos, predição de

genes de resistência antimicrobiana e genes de virulência foram realizadas utilizando as ferramentas SpeciesFinder 2.0, MLST 2.0, SCCmecFinder 1.2, spaTyper 1.0, PlasmidFinder 2.1, ResFinder 3.2, VirulenceFinder 2.0 respectivamente, disponíveis no site do CGE (*Center for Genomic Epidemiology*) (<https://www.genomicepidemiology.org/services/>) (Camacho *et al.*, 2009; Carattoli; Hasman, 2020; Larsen *et al.*, 2012; Zankari *et al.*, 2012). Além disso, ABricate v0.9.8 (<https://github.com/tseemann/abricate>) foi usado com o banco de dados de fatores de virulência (Chen, Lihong *et al.*, 2016) para prever genes de virulência. O banco de dados abrangente de resistência a antibióticos (<https://card.mcmaster.ca/home>) para predição de genes de resistência. Para todos os genes, foram utilizados valores superiores a 95% para cobertura e identidade.

Como os genes *mecA* e *femXAB* são considerados essenciais para a resistência à meticilina (Giannouli *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2022; Monteiro *et al.*, 2019), rastreamos esses genes para mutações no genoma da cepa *S. aureus* 549 sensível a meticilina *mecA* positivo. Além disso, mutações na região promotora (região a montante de 35 pb do local de início da tradução de *mecA*) podem afetar a resistência à cefoxitina/oxacilina (Liang *et al.*, 2022). Desta forma, a sequência para o gene *mecA* (2007 pb) e região a montante de 65 pb do local de início da tradução de *mecA*, genes *femA* (1.263 pb), *femB* (1.260 pb) e *femX* (1.266 pb), obtida da sequência completa do genoma da cepa de *S. aureus* 549, foram alinhadas às sequências da cepa de MRSA SQW1 (número de acesso do GenBank: CP045468.1) (Giannouli *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2022; Monteiro *et al.*, 2019), usando GeniousPrime 8.

RESULTADOS

De acordo com a montagem, o genoma apresenta tamanho total de 3.108.109 pb, com um conteúdo de GC de 32,8%, com 9 RNAs ribossômicos (rRNAs) e 64 RNAs transportadores (tRNAs). Foram identificadas 2.905 sequências de DNAs codificantes (CDSs). A cepa foi identificada como *S. aureus* tipo de sequência 1 (ST1), SCCmec tipo IVa (2B), *spa* type t922. Foram identificados genes relacionados à resistência para aminoglicosídeos, β -lactâmicos, trimetoprima e 7 bombas de efluxo. Quanto ao viruloma, foram identificados 31 genes relacionados a fatores de virulência, dentre estes, destacam-se *lukFS-PV* e *icaABCDR*, responsáveis pela formação da leucocidina Pantón-Valentine e biofilme, respectivamente. Também foram identificados 3 plasmídeos neste genoma (Tabela 1).

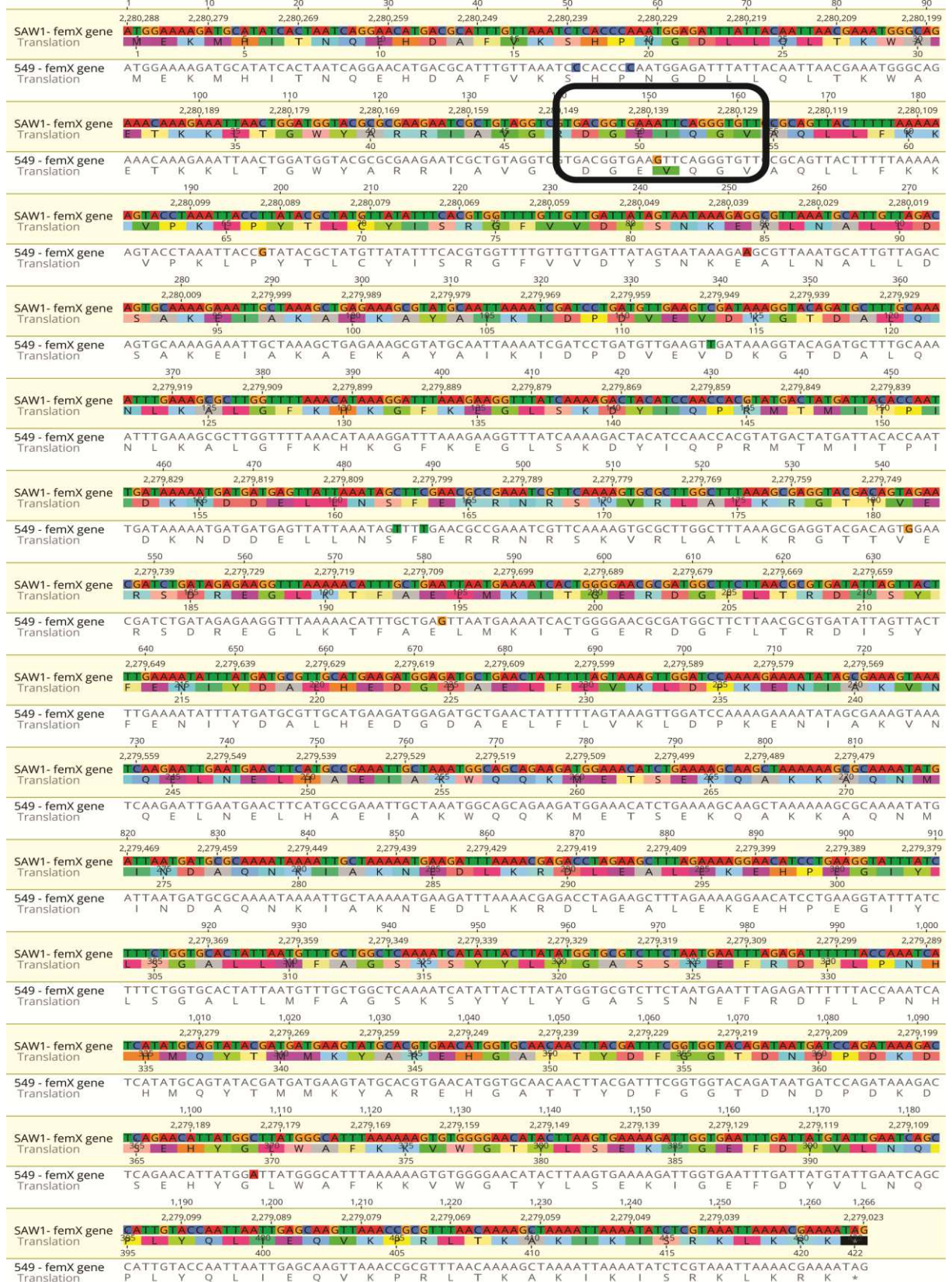
Tabela 1 – Análise do genoma de *Staphylococcus aureus* 549

Informação do genoma	
Tamanho do genoma (pb)	3.108.109
Número de <i>contigs</i>	153
CDSs	2.905
Número de rRNAs	9
Número de tRNAs	64
% GC	32,8
Dados epidemiológicos	
MLST	ST1
SCCmec	SCCmec tipo IVa (2B)
<i>spa</i> type	t922
Resistoma	
Aminoglicosídeos	<i>aph(3')-III*</i>
β -lactâmicos	<i>mecA</i> , <i>blaZ</i>
Macrolídeos	-
Fluoroquinolonas	-
Fenicolis	-
Lincosamidas	-
Tetraciclina	-
Trimetoprima	<i>drfG</i>
Bombas de efluxo	
	<i>arlS</i> , <i>arlR</i> , <i>arlG</i> , <i>mgrA</i> , <i>mepA</i> , <i>mepR</i> , <i>lmrS</i>
Viruloma	
	<i>hld</i> , <i>hlgABC</i> , <i>seb</i> , <i>seb</i> , <i>selq</i> , <i>selk</i> , <i>vWbp</i> , <i>sspC</i> , <i>sspAB</i> , <i>isdBCDEFG</i> , <i>isdEFG</i> , <i>srtB</i> , <i>hlyhla</i> , <i>ebp</i> , <i>lukFS-PV</i> , <i>fnbA</i> , <i>cap8ABCDEFGHIJKLMN</i> <i>OP</i> , <i>hysA</i> , <i>sbi</i> , <i>seh</i> , <i>adsA</i> , <i>lip</i> , <i>icaABCD</i> <i>R</i> , <i>aur</i> , <i>sdrC</i> , <i>sak</i> , <i>scn</i> , <i>geh</i> , <i>esxAB</i> , <i>esaABC</i> , <i>essABC</i>
Plasmídeos	
	<i>Rep16</i> , <i>rep5a</i> , <i>rep7c</i>

**aph(3')-III* – amikacin resistance.

O alinhamento dos genes *mecA* e *femB* de *S. aureus* 549 com SAW1 não mostraram mutações na sequência da cepa 549, apesar das diversas trocas de nucleotídeos. Por outro lado, foi encontrado uma mutação no gene *femX* (I51V) (Figuras 1 e 3) e também foram encontradas duas mutações no gene *femA* (Q36E e Y195F) (Figuras 2 e 4) da cepa 549.

Figura 1 – Alinhamento de sequência e tradução do gene *femX* do isolado *Staphylococcus aureus* 549 sensível a oxacilina *mecA* positivo (OS-MRSA), com a sequência da cepa SAW1 de *S. aureus*, resistente à oxacilina



Destaques na sequência do gene e tradução da cepa 549 de *S. aureus* indicam mudanças de nucleotídeos e/ou aminoácido, respectivamente, na sequência SAW1. O quadrado destaca uma mutação no gene *femX* da cepa 549 de *S. aureus* (I51V), mostrado em mais detalhes na Figura 3.

Figura 2 – Alinhamento de sequência e tradução do gene *femA* do isolado *Staphylococcus aureus* 549 sensível a oxacilina *mecA* positivo (OS-MRSA), com a sequência da cepa SAW1 de *S. aureus*, resistente à oxacilina



Destaques na sequência do gene e tradução da cepa 549 de *S. aureus* indicam mudanças de nucleotídeos e/ou aminoácido, respectivamente, na sequência SAW1. O quadrado destaca uma mutação no gene *femA* da cepa 549 de *S. aureus* (Q36E e Y195F), mostrados em mais detalhes na Figura 4.

Na sequência de *femX* da cepa 549, na posição do nucleotídeo 151 houve uma substituição de adenina por guanina, que gerou a troca do aminoácido número 51 de isoleucina para valina (I51V) (Figuras 1 e 3).

Na sequência de *femA* da cepa 549, na posição do nucleotídeo 106 houve uma substituição de citosina por guanina, que gerou a troca do aminoácido número 36 de glutamina para glutamato (Q36E), também na posição do nucleotídeo 584 houve uma substituição de adenina por timina, que gerou a troca do aminoácido número 195 de tirosina para fenilalanina (Y195F) (Figuras 2 e 4).

Figura 3 – Destaques mostrados na Figura 1 indicando uma mutação no gene *femX* do isolado *Staphylococcus aureus* 549 sensível a oxacilina *mecA* positivo (OS-MRSA) (I51V)

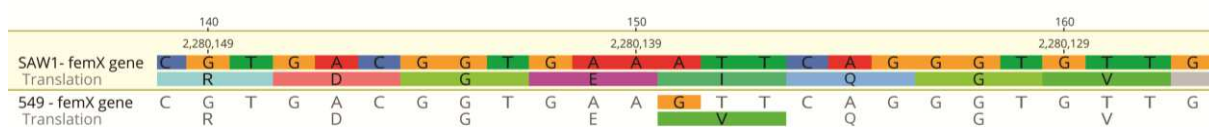
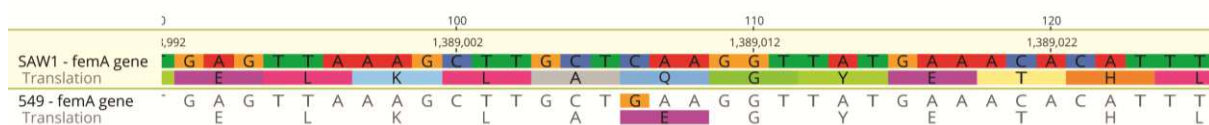
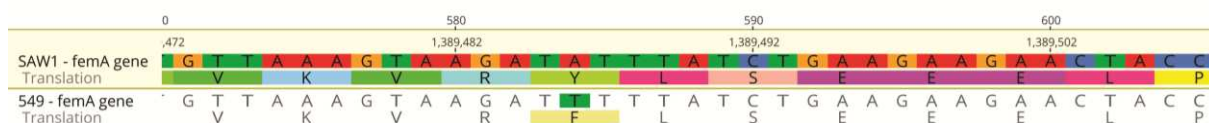


Figura 4 – Destaques mostrados na Figura 3 indicando uma mutação no gene *femA* do isolado *Staphylococcus aureus* 549 sensível a oxacilina *mecA* positivo (OS-MRSA) a) Q36E and b) Y195F

a)



b)



DISCUSSÃO

Os isolados bacterianos agrupados no CC1 e ST1 estão frequentemente associadas a infecções adquiridas na comunidade, sendo normalmente encontrados em países europeus e em animais rurais. Parece ser uma bactéria muito adaptável às condições do seu hospedeiro, seja ele animal ou humano (Lozano *et al.*, 2011).

Em *S. aureus*, o peptidoglicano é componente essencial da parede celular, de maneira que mantém a integridade estrutural do microrganismo, estando envolvido na divisão e crescimento celular (Vollmer; Blanot; De Pedro, 2008). Dentre as moléculas que compõem o

peptidoglicano, estão as pontes de glicina que são adicionadas pelas proteínas FemXAB (Rohrer; Berger-Bächi, 2003). A correta deposição de glicinas ao peptidoglicano garante a qualidade da parede e por consequência garante a resistência a meticilina em MRSA (Monteiro *et al.*, 2019; Rahman *et al.*, 2022; Strandén *et al.*, 1997). Como a resistência a meticilina é causada por alterações associadas a genes envolvidos no metabolismo da parede celular e os genes *femXAB* também estão envolvido na biossíntese da parede celular, a expressão diminuída de *femXAB* pode levar à sensibilidade a oxacilina no caso de isolados OS-MRSA (Berger-Bächi; Tschierske, 1998).

A análise da sequência de *femX* na cepa 549 OS-MRSA mostrou uma mutação (I51V), dado este, consistente com Brahma *et al.* (2019), que encontraram exatamente a mesma mutação e através da análise da expressão gênica, demonstraram uma expressão diminuída de todos os genes *fem* em comparação com MRSA. Outros autores também encontraram mutações em *femX* (Giannouli *et al.*, 2010). Estes resultados sugerem fortemente que a cepa 549 OS-MRSA também poderia ter a expressão de *femX* diminuída. Como a proteína FemX é responsável por depositar a primeira glicina da ponte de pentaglicina e essa glicina é essencial para parede celular estável, uma expressão diminuída de *femX* poderia causar um aumento na sensibilidade a meticilina.

O aumento da expressão do gene *femA* foi relatado em isolados MRSA de alto nível, contrariamente, a expressão foi relatada como reduzida em MRSA de baixo nível seguido por isolados de MSSA. Alterações nos genes *fem* parecem ser responsáveis pela diminuição da resistência a meticilina, de modo que *femA* parece ser essencial para a expressão de altos níveis de resistência a meticilina (Li *et al.*, 2012). Ao analisar a sequência de *femA* na cepa 549 OS-MRSA foram detectadas duas mutações (Q36E e Y195F) que, da mesma maneira que *femX*, foi reportada exatamente a mesma mutação (Y195F) por outros autores (Phaku *et al.*, 2016), que associaram essa mutação com OS-MRSA e ainda, que o aumento de mutações em *femA* restauram a sensibilidade a oxacilina em MRSA.

CONCLUSÃO

Nosso estudo indica que mutações em *femX* e *femA* em *S. aureus* que possuam *mecA* podem estar relacionadas com OS-MRSA, devido a provável expressão diminuída dos genes *fem* poder ser responsável pela sensibilidade a oxacilina em testes de sensibilidade antimicrobiana usuais. No entanto, a presença de mecanismos subjacentes operantes em OS-MRSA ainda é incerta e precisa de investigação. Outro fator que merece atenção é o fato de que

as proteínas resultantes dos genes *fem* podem ser possíveis alvos farmacológicos, especialmente FemX. Com mais pesquisas focadas em fatores adjacentes a *mecA*, no futuro poderemos ter antimicrobianos com maior eficiência, tanto para MRSA como para OS-MRSA.

REFERÊNCIAS

BERGER-BÄCHI, Brigitte. Expression of resistance to methicillin. **Trends in Microbiology**, vol. 2, no. 10, p. 389–393, Oct. 1994. [https://doi.org/10.1016/0966-842X\(94\)90617-3](https://doi.org/10.1016/0966-842X(94)90617-3).

BERGER-BÄCHI, Brigitte. Insertional inactivation of staphylococcal methicillin resistance by Tn551. **Journal of Bacteriology**, vol. 154, no. 1, p. 479–487, Apr. 1983. <https://doi.org/10.1128/jb.154.1.479-487.1983>.

BERGER-BÄCHI, Brigitte; STRÄSSLE, Anni; GUSTAFSON, John E.; KAYSER, Fritz. H. Mapping and characterization of multiple chromosomal factors involved in methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 36, no. 7, p. 1367–1373, Jul. 1992. <https://doi.org/10.1128/AAC.36.7.1367>.

BERGER-BÄCHI, Brigitte; TSCHIRSKE, Martin. Role of *fem* factors in methicillin resistance. **Drug Resistance Updates**, vol. 1, no. 5, p. 325–335, 1998. [https://doi.org/10.1016/S1368-7646\(98\)80048-4](https://doi.org/10.1016/S1368-7646(98)80048-4).

BOUCHER, Helen W.; TALBOT, George H.; BRADLEY, John S.; EDWARDS, John E.; GILBERT, David; RICE, Louis B.; SCHELD, Michael; SPELLBERG, Brad; BARTLETT, John. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, vol. 48, no. 1, p. 1–12, Jan. 2009. <https://doi.org/10.1086/595011>.

BRAHMA, Umarani; SHARMA, Paresh; MURTHY, Shweta; SHARMA, Savitri; CHAKRABORTY, Shalini; APPALARAJU, Sundarapu Naga; BHANDARI, Vasundhra. Decreased expression of *femXAB* genes and fnbp mediated biofilm pathways in OS-MRSA clinical isolates. **Scientific Reports**, vol. 9, no. 1, p. 16028, 5 Nov. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52557-z>.

CAMACHO, Christiam; COULOURIS, George; AVAGYAN, Vahram; MA, Ning; PAPADOPOULOS, Jason; BEALER, Kevin; MADDEN, Thomas L. BLAST+: architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, vol. 10, no. 1, p. 421, 15 Dec. 2009. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>.

CARATTOLI, Alessandra; HASMAN, Henrik. PlasmidFinder and In Silico pMLST: Identification and Typing of Plasmid Replicons in Whole-Genome Sequencing (WGS). **Horizontal Gene Transfer. Methods in Molecular Biology**. New York: Humana Press, 2020. vol. 2075, p. 285–294. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9877-7_20.

CHEN, Lihong; ZHENG, Dandan; LIU, Bo; YANG, Jian; JIN, Qi. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis—10 years on. **Nucleic Acids Research**, vol. 44, no. D1, p. D694–D697, 4 Jan. 2016. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1239>.

CHUNG, Marilyn; KIM, Choon Keun; CONCEIÇÃO, Teresa; AIRES-DE-SOUSA, Marta; DE LENCASTRE, Hermínia; TOMASZ, Alexander. Heterogeneous oxacillin-resistant phenotypes and production of PBP2a by oxacillin-susceptible/*mecA*-positive MRSA strains from Africa. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 71, no. 10, p. 2804–2809, Oct. 2016. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw209>.

DUARTE, Felipe Crepaldi; DANELLI, Tiago; TAVARES, Eliandro Reis; MORGUETTE, Ana Elisa Belotto; KERBAUY, Gilselena; GRION, Cintia Magalhães Carvalho; YAMAUCHI, Lucy Megumi; PERUGINI, Marcia Regina Eches; YAMADA-OGATTA, Sueli Fumie. Fatal sepsis caused by *mecA*-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: First report in a tertiary hospital of southern Brazil. **Journal of Infection and Chemotherapy**, vol. 25, no. 4, p. 293–297, Apr. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2018.09.010>.

GIANNOULI, Stamatina; LABROU, Maria; KYRITSIS, Athanassios; IKONOMIDIS, Alexandros; POURNARAS, Spyros; STATHOPOULOS, Constantinos; TSAKRIS, Athanassios. Detection of mutations in the FemXAB protein family in oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 65, no. 4, p. 626–633, 1 Apr. 2010. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq039>.

HAU, Samantha J.; BAYLES, Darrell O.; ALT, David P.; NICHOLSON, Tracy L. Draft Genome Sequences of 50 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Sequence Type 5 Isolates Obtained from a U.S. Hospital. **Genome Announcements**, vol. 5, no. 44, 2 Nov. 2017. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01083-17>.

HISATSUNE, Junzo; HAGIYA, Hideharu; SHIOTA, Sumiko; SUGAI, Motoyuki. Complete Genome Sequence of Systemically Disseminated Sequence Type 8 Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type IVI Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Genome Announcements**, vol. 5, no. 35, 31 Aug. 2017. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00852-17>.

LABISCHINSKI, Harald. Consequences of the interaction of β -lactam antibiotics with penicillin binding proteins from sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Medical Microbiology and Immunology**, vol. 181, no. 5, p. 241–265, Nov. 1992. <https://doi.org/10.1007/BF00198846>.

LARSEN, Mette V.; COSENTINO, Salvatore; RASMUSSEN, Simon; FRIIS, Carsten; HASMAN, Henrik; MARVIG, Rasmus Lykke; JELSBÄK, Lars; SICHERITZ-PONTÉN, Thomas; USSERY, David W.; AARESTRUP, Frank M.; LUND, Ole. Multilocus Sequence Typing of Total-Genome-Sequenced Bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 50, no. 4, p. 1355–1361, Apr. 2012. <https://doi.org/10.1128/JCM.06094-11>.

LI, X.; XIONG, Y.; FAN, X.; FENG, P.; TANG, H.; ZHOU, T. The role of *femA* regulating gene on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **Médecine et Maladies Infectieuses**, vol. 42, no. 5, p. 218–225, May 2012. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2008.09.031>.

LIANG, Bingshao; XIONG, Zhile; LIANG, Zhuwei; ZHANG, Chao; CAI, Hao; LONG, Yan; GAO, Fei; WANG, Jielin; DENG, Qiulian; ZHONG, Huamin; XIE, Yongqiang; HUANG, Lianfen; GONG, Sitang; ZHOU, Zhenwen. Genomic Basis of Occurrence of Cryptic Resistance among Oxacillin- and Cefoxitin-Susceptible *mecA* -Positive *Staphylococcus aureus*. **Microbiology Spectrum**, vol. 10, no. 3, 29 Jun. 2022. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00291-22>.

LIN, Derek M; KOSKELLA, Britt; LIN, Henry C. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**, vol. 8, no. 3, p. 162, 2017. <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v8.i3.162>.

LINDSAY, Jodi A.; HOLDEN, Matthew T.G. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? **Trends in Microbiology**, vol. 12, no. 8, p. 378–385, Aug. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.06.004>.

LOZANO, C.; ASPIROZ, C.; ARA, M.; GÓMEZ-SANZ, E.; ZARAZAGA, M.; TORRES, C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 in a farmer with skin lesions and in pigs of his farm: clonal relationship and detection of *lnu(A)* gene. **Clinical Microbiology and Infection**, vol. 17, no. 6, p. 923–927, Jun. 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03437.x>.

MONTEIRO, João M.; COVAS, Gonçalo; RAUSCH, Daniela; FILIPE, Sérgio R.; SCHNEIDER, Tanja; SAHL, Hans-Georg; PINHO, Mariana G. The pentaglycine bridges of *Staphylococcus aureus* peptidoglycan are essential for cell integrity. **Scientific Reports**, vol. 9, no. 1, p. 5010, 21 Mar. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41461-1>.

OCHIENG' ODUOR, Joseph M.; ONKOBA, Nyamongo; MALOBA, Fredrick; NYACHIEO, Atunga. Experimental phage therapy against haematogenous multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia in mice. **African Journal of Laboratory Medicine**, vol. 5, no. 1, 1 Feb. 2016. <https://doi.org/10.4102/ajlm.v5i1.435>.

PHAKU, P.; LEBUGHE, M.; STRAUSS, L.; PETERS, G.; HERRMANN, M.; MUMBA, D.; MELLMANN, A.; MUYEMBE-TAMFUM, J.-J.; SCHAUMBURG, F. Unveiling the molecular basis of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* from the Democratic Republic of the Congo using whole genome sequencing. **Clinical Microbiology and Infection**, vol. 22, no. 7, p. 644.e1-644.e5, Jul. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.04.009>.

RAHMAN, Shakilur; RAJAK, Karunamoy; MISHRA, Sabyashachi; DAS, Amit Kumar. Identification of potential inhibitors against FemX of *Staphylococcus aureus*: A hierarchial *in-silico* drug repurposing approach. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, vol. 115, no. February, p. 108215, Sep. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2022.108215>.

REYNOLDS, Peter E.; FULLER, Christopher. Methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*; presence of identical additional penicillin-binding protein in all strains examined. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 33, no. 2–3, p. 251–254, Feb. 1986. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1986.tb01281.x>.

ROHRER, S.; BERGER-BÄCHI, B. FemABX Peptidyl Transferases: a Link between Branched-Chain Cell Wall Peptide Formation and β -Lactam Resistance in Gram-Positive Cocci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 47, no. 3, p. 837–846, Mar. 2003. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.3.837-846.2003>.

SEEMANN, Torsten. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, vol. 30, no. 14, p. 2068–2069, 15 Jul. 2014. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.

STRANDÉN, Anne M.; EHLERT, Kerstin; LABISCHINSKI, Harald; BERGER-BÄCHI, B. Cell wall monoglycine cross-bridges and methicillin hypersusceptibility in a *femAB* null mutant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, vol. 179, no. 1, p. 9–16, Jan. 1997. <https://doi.org/10.1128/jb.179.1.9-16.1997>.

VOLLMER, Waldemar; BLANOT, Didier; DE PEDRO, Miguel A. Peptidoglycan structure and architecture. **FEMS Microbiology Reviews**, vol. 32, no. 2, p. 149–167, Mar. 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x>.

ZANKARI, Ea; HASMAN, Henrik; COSENTINO, Salvatore; VESTERGAARD, Martin; RASMUSSEN, Simon; LUND, Ole; AARESTRUP, Frank M.; LARSEN, Mette Voldby. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 67, no. 11, p. 2640–2644, 1 Nov. 2012. <https://doi.org/10.1093/jac/dks261>.

6 CONCLUSÃO

Uma possível alternativa para as dificuldades no diagnóstico e no tratamento de OS-MRSA seriam pesquisas focadas em fatores relacionados com a formação da parede bacteriana ou outros fatores adjacentes a *mecA*, como os genes *fem* e suas proteínas. Como as mutações nos genes *femXAB* parecem ter relação com o nível de resistência a meticilina, esse operon deve ser mais intensamente estudado. No entanto, a presença de outros mecanismos operantes em OS-MRSA ainda é incerta e precisa de investigação. Outros fatores que também merecem atenção são a pesquisas e o desenvolvimento de fármacos direcionados a estes fatores adjacentes a *mecA*, os quais, podem ser uma solução para infecções por MRSA e OS-MRSA no futuro.

Por serem microrganismos de grande importância clínica, por estarem envolvidos em diversos tipos de infecções comunitárias e hospitalares, por serem agentes colonizantes de pele e mucosas, por serem extremamente resistentes aos antimicrobianos e pela possibilidade de levar a desfechos clínicos desfavoráveis ao paciente, *S. aureus* necessitam ser mais estudados, especialmente aqueles isolados OS-MRSA, que geram grande dificuldades na correta identificação laboratorial, e por consequência podem gerar problemas na terapêutica ideal.

REFERÊNCIAS

- ABUBAKAR, Usman; AL-ANAZI, Menier; ALANAZI, Zainab; RODRÍGUEZ-BAÑO, Jesús. Impact of COVID-19 pandemic on multidrug resistant gram positive and gram negative pathogens: A systematic review. **Journal of Infection and Public Health**, vol. 16, no. 3, p. 320–331, Mar. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2022.12.022>.
- AHMAD-MANSOUR, Nour; LOUBET, Paul; POUGET, Cassandra; DUNYACH-REMY, Catherine; SOTTO, Albert; LAVIGNE, Jean-Philippe; MOLLE, Virginie. *Staphylococcus aureus* Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments. **Toxins**, vol. 13, no. 10, p. 677, 23 Sep. 2021. <https://doi.org/10.3390/toxins13100677>.
- ANDRADE-FIGUEIREDO, Mariana; LEAL-BALBINO, Tereza Cristina. Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil. **BMC Microbiology**, vol. 16, no. 1, p. 115, 21 Dec. 2016. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0733-4>.
- ARUMAIRAJ, Antony; SAFAVI, Ali; AMIN, Hossam; POOR, Armeen; TRENARD, Natoushka. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Empyema Post-COVID Infection Causing Severe Septic Shock and Multiorgan Failure. **Cureus**, vol. 15, no. 6, p. 6–10, 27 Jun. 2023. <https://doi.org/10.7759/cureus.41054>.
- AUSUBEL, Frederick M.; BRENT, Roger; KINGSTON, Robert E.; MOORE, David D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, John A.; STRUHL, Kevin. **Short Protocols in Molecular Biology**. 4th ed. New York: John Wiley & Sons, 1999.
- AYKAC, Kubra; OZSUREKCI, Yasemin; TANIR BASARANOGU, Sevgen. Future Directions and Molecular Basis of Ventilator Associated Pneumonia. **Canadian Respiratory Journal**, vol. 2017, no. i, p. 1–8, Oct. 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/2614602>.
- BABU RAJENDRAN, N.; MUTTERS, N.T.; MARASCA, G.; CONTI, M.; SIFAKIS, F.; VUONG, C.; VOSS, A.; BAÑO, J.R.; TACCONELLI, E. Mandatory surveillance and outbreaks reporting of the WHO priority pathogens for research & discovery of new antibiotics in European countries. **Clinical Microbiology and Infection**, vol. 26, no. 7, p. 943.e1–943.e6, Jul. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.11.020>.
- BECKER, Karsten; VAN ALEN, Sarah; IDELEVICH, Evgeny A.; SCHLEIMER, Nina; SEGGEWISS, Jochen; MELLMANN, Alexander; KASPAR, Ursula; PETERS, Georg. Plasmid-Encoded Transferable *mecB*-Mediated Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Emerging Infectious Diseases**, vol. 24, no. 2, p. 242–248, Feb. 2018. <https://doi.org/10.3201/eid2402.171074>.
- BERGER-BÄCHI, Brigitte. Expression of resistance to methicillin. **Trends in Microbiology**, vol. 2, no. 10, p. 389–393, Oct. 1994. [https://doi.org/10.1016/0966-842X\(94\)90617-3](https://doi.org/10.1016/0966-842X(94)90617-3).
- BERGER-BÄCHI, Brigitte. Insertional inactivation of staphylococcal methicillin resistance by Tn551. **Journal of Bacteriology**, vol. 154, no. 1, p. 479–487, Apr. 1983. <https://doi.org/10.1128/jb.154.1.479-487.1983>.

BERGER-BÄCHI, Brigitte; BARBERIS-MAINO, Luisella; STRÄSSLE, Anni; KAYSER, Fritz H. FemA, a host-mediated factor essential for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Molecular cloning and characterization. **Molecular and General Genetics MGG**, vol. 219, no. 1–2, p. 263–269, Oct. 1989. <https://doi.org/10.1007/BF00261186>.

BERGER-BÄCHI, Brigitte; STRÄSSLE, Anni; GUSTAFSON, John E.; KAYSER, Fritz. H. Mapping and characterization of multiple chromosomal factors involved in methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 36, no. 7, p. 1367–1373, Jul. 1992. <https://doi.org/10.1128/AAC.36.7.1367>.

BERGER-BÄCHI, Brigitte; TSCHERSKE, Martin. Role of *fem* factors in methicillin resistance. **Drug Resistance Updates**, vol. 1, no. 5, p. 325–335, 1998. [https://doi.org/10.1016/S1368-7646\(98\)80048-4](https://doi.org/10.1016/S1368-7646(98)80048-4).

BETTIN, Alfonso; CAUSIL, Ceyla; REYES, Niradiz. Molecular identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* nasal isolates from medical students in Cartagena, Colombia. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, vol. 16, no. 4, p. 329–334, Jul. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.06.017>.

BÖING, Christian W.; FROBÖSE, Neele J.; SCHAUMBURG, Frieder; KAMPMEIER, Stefanie. Impact of the COVID-19 Pandemic on the Management of *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections in a Tertiary Care Hospital. **Pathogens**, vol. 12, no. 4, p. 611, 18 Apr. 2023. <https://doi.org/10.3390/pathogens12040611>.

BOONSIRI, Tanit; WATANABE, Shinya; TAN, Xin-Ee; THITIANANPAKORN, Kanate; NARIMATSU, Ryu; SASAKI, Kosuke; TAKENOCHI, Remi; SATO'O, Yusuke; AIBA, Yoshifumi; KIGA, Kotaro; SASAHARA, Teppei; TAKI, Yusuke; LI, Feng-Yu; ZHANG, Yuancheng; AZAM, Aa Haeruman; KAWAGUCHI, Tomofumi; CUI, Longzhu. Identification and characterization of mutations responsible for the β -lactam resistance in oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*. **Scientific Reports**, vol. 10, no. 1, p. 16907, 9 Oct. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73796-5>.

BOUCHER, Helen W.; TALBOT, George H.; BRADLEY, John S.; EDWARDS, John E.; GILBERT, David; RICE, Louis B.; SCHELD, Michael; SPELLBERG, Brad; BARTLETT, John. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, vol. 48, no. 1, p. 1–12, Jan. 2009. <https://doi.org/10.1086/595011>.

BOYLE-VAVRA, S.; ERESHEFSKY, Ben; WANG, C.-C.; DAUM, Robert S. Successful Multiresistant Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Lineage from Taipei, Taiwan, That Carries Either the Novel Staphylococcal Chromosome Cassette *mec* (SCC*mec*) Type VT or SCC*mec* Type IV. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 43, no. 9, p. 4719–4730, 1 Sep. 2005. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4719-4730.2005>.

BRAHMA, Umarani; SHARMA, Paresh; MURTHY, Shweta; SHARMA, Savitri; CHAKRABORTY, Shalini; APPALARAJU, Sundarapu Naga; BHANDARI, Vasundhra. Decreased expression of *femXAB* genes and *fmbp* mediated biofilm pathways in OS-MRSA clinical isolates. **Scientific Reports**, vol. 9, no. 1, p. 16028, 5 Nov. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52557-z>.

BRAMBILLA, Lara Z.S.; ENDO, Eliana H.; CORTEZ, Diógenes A.G.; DIAS FILHO, Benedito P. Anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus* MRSA and MSSA of neolignans and extract of *Piper regnellii*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 27, no. 1, p. 112–117, Jan. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.08.008>.

BRCast. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. 2024. Available at: <https://brcast.org.br/documentos/documentos-3/>. Accessed on: 29 Jul. 2024.

BUCHAN, Kyle D.; FOSTER, Simon J.; RENSHAW, Stephen A. *Staphylococcus aureus*: setting its sights on the human innate immune system. **Microbiology**, , p. 1–19, 9 Jan. 2019. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000759>.

BUCK, Jessica M; COMO-SABETTI, Kathryn; HARRIMAN, Kathleen H; DANILA, Richard N; BOXRUD, David J; GLENNEN, Anita; LYNFIELD, Ruth. Community-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Minnesota, 2000–2003. **Emerging Infectious Diseases**, vol. 11, no. 10, p. 1532–1538, Oct. 2005. <https://doi.org/10.3201/eid1110.050141>.

BURIAN, Marc; RAUTENBERG, Maren; KOHLER, Thomas; FRITZ, Michaela; KRISMER, Bernhard; UNGER, Clemens; HOFFMANN, Wolfgang H.; PESCHEL, Andreas; WOLZ, Christiane; GOERKE, Christiane. Temporal Expression of Adhesion Factors and Activity of Global Regulators during Establishment of *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization. **The Journal of Infectious Diseases**, vol. 201, no. 9, p. 1414–1421, May 2010. <https://doi.org/10.1086/651619>.

CALFEE, David P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci, and other Gram-positives in healthcare. **Current Opinion in Infectious Diseases**, vol. 25, no. 4, p. 385–394, Aug. 2012. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3283553441>.

CAMACHO, Christiam; COULOURIS, George; AVAGYAN, Vahram; MA, Ning; PAPADOPOULOS, Jason; BEALER, Kevin; MADDEN, Thomas L. BLAST+: architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, vol. 10, no. 1, p. 421, 15 Dec. 2009. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>.

CAMPBELL, Steven J.; DESHMUKH, Hitesh S.; NELSON, Charlotte L.; BAE, I.-G.; STRYJEWSKI, Martin E.; FEDERSPIEL, Jerome J.; TONTHAT, Giang T.; RUDE, Thomas H.; BARRIERE, Steven L.; COREY, Ralph; FOWLER, Vance G. Genotypic Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from a Multinational Trial of Complicated Skin and Skin Structure Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 46, no. 2, p. 678–684, 1 Feb. 2008. <https://doi.org/10.1128/JCM.01822-07>.

CANTÓN, Rafael; GIJÓN, Desirée; RUIZ-GARBAJOSA, Patricia. Antimicrobial resistance in ICUs: an update in the light of the COVID-19 pandemic. **Current Opinion in Critical Care**, vol. 26, no. 5, p. 433–441, Oct. 2020. <https://doi.org/10.1097/MCC.0000000000000755>.

CARATTOLI, Alessandra; HASMAN, Henrik. PlasmidFinder and In Silico pMLST: Identification and Typing of Plasmid Replicons in Whole-Genome Sequencing (WGS). **Horizontal Gene Transfer. Methods in Molecular Biology**. New York: Humana Press, 2020. vol. 2075, p. 285–294. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9877-7_20.

CDC. Antibiotic Resistance Threats in United States, 2013. 2013. **Centers for Diseases Control and Prevention**. Available at: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>. Accessed on: 7 Nov. 2018.

CDC. Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. 2007. **Centers for Diseases Control and Prevention**. Available at: <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/isolation/index.html>. Accessed on: 19 Jun. 2019.

CHANG, Soju; SIEVERT, Dawn M.; HAGEMAN, Jeffrey C.; BOULTON, Matthew L.; TENOVER, Fred C.; DOWNES, Frances Pouch; SHAH, Sandip; RUDRIK, James T.; PUPP, Guy R.; BROWN, William J.; CARDO, Denise; FRIDKIN, Scott K. Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Containing the *vanA* Resistance Gene. **New England Journal of Medicine**, vol. 348, no. 14, p. 1342–1347, 3 Apr. 2003. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa025025>.

CHEN, Feng-jui; HUANG, I-wen; WANG, Chen-her; CHEN, Pei-chen; WANG, Hui-yin; LAI, Jui-fen; SHIAU, Yih-ru; LAUDERDALE, Tsai-ling Yang. *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* with Low-Level Oxacillin MIC in Taiwan. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 50, no. 5, p. 1679–1683, Feb. 2012. <https://doi.org/10.1128/JCM.06711-11>.

CHEN, Hongbin; YIN, Yuyao; VAN DORP, Lucy; SHAW, Liam P.; GAO, Hua; ACMAN, Mislav; YUAN, Jizhen; CHEN, Fengning; SUN, Shijun; WANG, Xiaojuan; LI, Shuguang; ZHANG, Yawei; FARRER, Rhys A.; WANG, Hui; BALLOUX, Francois. Drivers of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) lineage replacement in China. **Genome Medicine**, vol. 13, no. 1, p. 171, 28 Dec. 2021. <https://doi.org/10.1186/s13073-021-00992-x>.

CHEN, Lihong; ZHENG, Dandan; LIU, Bo; YANG, Jian; JIN, Qi. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis—10 years on. **Nucleic Acids Research**, vol. 44, no. D1, p. D694–D697, 4 Jan. 2016. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1239>.

CHENG, Alice G.; DEDENT, Andrea C.; SCHNEEWIND, Olaf; MISSIAKAS, Dominique. A play in four acts: *Staphylococcus aureus* abscess formation. **Trends in Microbiology**, vol. 19, no. 5, p. 225–232, May 2011. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.01.007>.

CHUNG, Marilyn; KIM, Choon Keun; CONCEIÇÃO, Teresa; AIRES-DE-SOUSA, Marta; DE LENCASTRE, Hermínia; TOMASZ, Alexander. Heterogeneous oxacillin-resistant phenotypes and production of PBP2a by oxacillin-susceptible/*mecA*-positive MRSA strains from Africa. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 71, no. 10, p. 2804–2809, Oct. 2016. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw209>.

CONCEIÇÃO, Teresa; COELHO, Céline; DE LENCASTRE, Herminia; DE SOUSA, Marta Aires. Frequent occurrence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) strains in two African countries. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 70, no. 12, p. 3200–3204, Aug. 2015. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv261>.

CORRENTE, M; NORMANNO, G; MARTELLA, V; BELLACICCO, A L; QUAGLIA, N C; DAMBROSIO, A; BUONAVOGLIA, D; ABRAMO, M D; BUONAVOGLIA, C. Comparison of methods for the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from food products. **Letters in Applied Microbiology**, vol. 45, no. 5, p. 535–539, Jun. 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02226.x>.

D'AGATA, Erica M. C.; WEBB, Glenn F.; HORN, Mary Ann; MOELLERING, JR., Robert C.; RUAN, Shigui. Modeling the Invasion of Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* into Hospitals. **Clinical Infectious Diseases**, vol. 48, no. 3, p. 274–284, Feb. 2009. <https://doi.org/10.1086/595844>.

DANELLI, Tiago; DUARTE, Felipe Crepaldi; OLIVEIRA, Thilara Alessandra de; SILVA, Raquel Soares da; FRIZON ALFIERI, Daniela; GONÇALVES, Guilherme Bartolomeu; OLIVEIRA, Caio Ferreira de; TAVARES, Eliandro Reis; YAMAUCHI, Lucy Megumi; PERUGINI, Marcia Regina Eches; YAMADA-OGATTA, Sueli Fumie. Nasal Carriage by *Staphylococcus aureus* among Healthcare Workers and Students Attending a University Hospital in Southern Brazil: Prevalence, Phenotypic, and Molecular Characteristics. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, vol. 2020, p. 1–11, 3 Dec. 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/3808036>.

DAVID, Michael Z.; DAUM, Robert S. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 23, no. 3, p. 616–687, 1 Jul. 2010. <https://doi.org/10.1128/CMR.00081-09>.

DAVID, Michael Z.; GLIKMAN, Daniel; CRAWFORD, Susan E.; PENG, Jie; KING, Kimberly J.; HOSTETLER, Mark A.; BOYLE-VAVRA, Susan; DAUM, Robert S. What Is Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*? **The Journal of Infectious Diseases**, vol. 197, no. 9, p. 1235–1243, May 2008. <https://doi.org/10.1086/533502>.

DE JONGE, B L; DE LENCASTRE, H; TOMASZ, A. Suppression of autolysis and cell wall turnover in heterogeneous Tn551 mutants of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. **Journal of Bacteriology**, vol. 173, no. 3, p. 1105–1110, Feb. 1991. <https://doi.org/10.1128/jb.173.3.1105-1110.1991>.

DE JONGE, B L; SIDOW, T.; CHANG, Y. S.; LABISCHINSKI, H.; BERGER-BACHI, B.; GAGE, D. A.; TOMASZ, A. Altered mucopeptide composition in *Staphylococcus aureus* strains with an inactivated *femA* locus. **Journal of Bacteriology**, vol. 175, no. 9, p. 2779–2782, May 1993. <https://doi.org/10.1128/jb.175.9.2779-2782.1993>.

DE OLIVEIRA, David M. P.; FORDE, Brian M; KIDD, Timothy J; HARRIS, Patrick N A; SCHEMBRI, Mark A.; BEATSON, Scott A.; PATERSON, David L.; WALKER, Mark J. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 33, no. 3, p. 1–49, 17 Jun. 2020. <https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19>.

DUARTE, Felipe Crepaldi; DANELLI, Tiago; TAVARES, Eliandro Reis; MORGUETTE, Ana Elisa Belotto; KERBAUY, Gilselena; GRION, Cintia Magalhães Carvalho; YAMAUCHI, Lucy Megumi; PERUGINI, Marcia Regina Eches; YAMADA-OGATTA, Sueli Fumie. Fatal sepsis caused by *mecA*-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: First report in a tertiary hospital of southern Brazil. **Journal of Infection and Chemotherapy**, vol. 25, no. 4, p. 293–297, Apr. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2018.09.010>.

DUMONT, Ashley L.; YOONG, Pauline; LIU, Xiang; DAY, Christopher J.; CHUMBLER, Nicole M.; JAMES, David B. A.; ALONZO, Francis; BODE, Nadine J.; LACY, D. Borden; JENNINGS, Michael P.; TORRES, Victor J. Identification of a Crucial Residue Required for *Staphylococcus aureus* LukAB Cytotoxicity and Receptor Recognition. **Infection and Immunity**, vol. 82, no. 3, p. 1268–1276, Mar. 2014. <https://doi.org/10.1128/IAI.01444-13>.

DURAND, G.; BES, M.; MEUGNIER, H.; ENRIGHT, M. C.; FOREY, F.; LIASSINE, N.; WENGER, A.; KIKUCHI, K.; LINA, G.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J. Detection of New Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones Containing the Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Gene Responsible for Hospital- and Community-Acquired Infections in France. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 44, no. 3, p. 847–853, 1 Mar. 2006. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.847-853.2006>.

DYKE, K. G. H. Penicillinase production and intrinsic resistance to penicillins in methicillin-resistant cultures of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, vol. 2, no. 3, p. 261–278, 1 Aug. 1969. <https://doi.org/10.1099/00222615-2-3-261>.

ELISABETH, Paramythiotou; MARIA, Souli; IRENE, Galani; HELEN, Giamarellou; APOSTOLOS, Armaganidis. Success stories about severe pneumonia caused by Panton–Valentine leucocidin-producing *Staphylococcus aureus*. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, vol. 18, no. 3, p. 341–345, May 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2013.11.011>.

EMANEINI, Mohammad; JABALAMELI, Fereshteh; RAHDAR, Hosseinali; LEEUWEN, Willem B. van; BEIGVERDI, Reza. Nasal carriage rate of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* among Iranian healthcare workers: a systematic review and meta-analysis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 50, no. 5, p. 590–597, Sep. 2017. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0534-2016>.

FARIA, Nuno A.; CONCEIÇÃO, Teresa; MIRAGAIA, Maria; BARTELS, Mette Damkjær; DE LENCASTRE, Hermínia; WESTH, Henrik. Nasal Carriage of Methicillin Resistant *Staphylococci*. **Microbial Drug Resistance**, vol. 20, no. 2, p. 108–117, Apr. 2014. <https://doi.org/10.1089/mdr.2013.0197>.

FOSTER, Timothy J; GEOGHEGAN, Joan A; GANESH, Vannakambadi K; HÖÖK, Magnus. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Microbiology**, vol. 12, no. 1, p. 49–62, 16 Jan. 2014. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3161>.

FRANCOIS, Patrice; BENTO, Manuela; RENZI, Gesuele; HARBARTH, Stephan; PITTET, Didier; SCHRENZEL, Jacques. Evaluation of three molecular assays for rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 45, no. 6, p. 2011–2013, Jun. 2007. <https://doi.org/10.1128/JCM.00232-07>.

GIANNELLA, M.; BARTOLETTI, M.; GATTI, M.; VIALE, P. Advances in the therapy of bacterial bloodstream infections. **Clinical Microbiology and Infection**, vol. 26, no. 2, p. 158–167, Feb. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.11.001>.

GIANNOULI, Stamatina; LABROU, Maria; KYRITSIS, Athanassios; IKONOMIDIS, Alexandros; POURNARAS, Spyros; STATHOPOULOS, Constantinos; TSAKRIS, Athanassios. Detection of mutations in the FemXAB protein family in oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 65, no. 4, p. 626–633, 1 Apr. 2010. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq039>.

GILLET, Yves; ISSARTEL, Bertrand; VANHEMS, Philippe; FOURNET, Jean-Christophe; LINA, Gerard; BES, Michèle; VANDENESCH, François; PIÉMONT, Yves; BROUSSE, Nicole; FLORET, Daniel; ETIENNE, Jerome. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. **The Lancet**, vol. 359, no. 9308, p. 753–759, Mar. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)07877-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)07877-7).

GOPIKRISHNAN, Mohanraj; HARYINI, Sree; C, George Priya Doss. Emerging strategies and therapeutic innovations for combating drug resistance in *Staphylococcus aureus* strains: A comprehensive review. **Journal of Basic Microbiology**, vol. 64, no. 5, 2 May 2024. <https://doi.org/10.1002/jobm.202300579>.

HAIR, Pamela S.; ECHAGUE, Charlene G.; SHOLL, Amber M.; WATKINS, Justin A.; GEOGHEGAN, Joan A.; FOSTER, Timothy J.; CUNNION, Kenji M. Clumping Factor A Interaction with Complement Factor I Increases C3b Cleavage on the Bacterial Surface of *Staphylococcus aureus* and Decreases Complement-Mediated Phagocytosis. **Infection and Immunity**, vol. 78, no. 4, p. 1717–1727, 1 Apr. 2010. <https://doi.org/10.1128/IAI.01065-09>.

HARKINS, Catriona P.; PICHON, Bruno; DOUMITH, Michel; PARKHILL, Julian; WESTH, Henrik; TOMASZ, Alexander; DE LENCASTRE, Herminia; BENTLEY, Stephen D.; KEARNS, Angela M.; HOLDEN, Matthew T. G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. **Genome Biology**, vol. 18, no. 1, p. 130, 20 Dec. 2017. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1252-9>.

HARTMAN, B.; TOMASZ, A. Altered penicillin-binding proteins in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 19, no. 5, p. 726–735, 1 May 1981. <https://doi.org/10.1128/AAC.19.5.726>.

HAU, Samantha J.; BAYLES, Darrell O.; ALT, David P.; NICHOLSON, Tracy L. Draft Genome Sequences of 50 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Sequence Type 5 Isolates Obtained from a U.S. Hospital. **Genome Announcements**, vol. 5, no. 44, 2 Nov. 2017. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01083-17>.

HE, Wenqiang; CHEN, Hongbin; ZHAO, Chunjiang; ZHANG, Feifei; WANG, Hui. Prevalence and molecular typing of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* from multiple hospitals in China. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, vol. 77, no. 3, p. 267–269, Aug. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.07.001>.

HEGER, Margaret L.; AL-SAYYAD, Ban. Ceftaroline and Daptomycin Combination Antibiotic Therapy for a Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Liver Abscess in a Premature Infant. **The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics**, vol. 27, no. 8, p. 754–759, 1 Dec. 2022. <https://doi.org/10.5863/1551-6776-27.8.754>.

HEILMANN, Christine; SCHWEITZER, Oliver; GERKE, Christiane; VANITTANAKOM, Nongnuch; MACK, Dietrich; GÖTZ, Friedrich. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. **Molecular Microbiology**, vol. 20, no. 5, p. 1083–1091, Jun. 1996. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02548.x>.

HIRAMATSU, K.; HANAKI, H.; INO, T.; K. YABUTA; OGURI, T.; TENOVER, F. C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 40, no. 1, p. 135–136, 1 Jul. 1997. <https://doi.org/10.1093/jac/40.1.135>.

HIRAMATSU, Keiichi. The Emergence of *Staphylococcus aureus* With Reduced Susceptibility to Vancomycin in Japan. **The American Journal of Medicine**, vol. 104, no. 5A, p. 7S-10S, May 1998. .

HIROTAKI, S.; SASAKI, T.; KUWAHARA-ARAI, K.; HIRAMATSU, K. Rapid and Accurate Identification of Human-Associated Staphylococci by Use of Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 49, no. 10, p. 3627–3631, 1 Oct. 2011. <https://doi.org/10.1128/JCM.00488-11>.

HISATSUNE, Junzo; HAGIYA, Hideharu; SHIOTA, Sumiko; SUGAI, Motoyuki. Complete Genome Sequence of Systemically Disseminated Sequence Type 8 Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type IVI Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Genome Announcements**, vol. 5, no. 35, 31 Aug. 2017. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00852-17>.

HOLLAND, Thomas L.; ARNOLD, Christopher; FOWLER, Vance G. Clinical Management of *Staphylococcus aureus* Bacteremia. **JAMA**, vol. 312, no. 13, p. 1330, 1 Oct. 2014. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.9743>.

HOLLAND, Thomas L; BAYER, Arnold S; FOWLER, Vance G. Persistent methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia: Resetting the Clock for Optimal Management. **Clinical Infectious Diseases**, vol. 75, no. 9, p. 1668–1674, 29 Oct. 2022. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac364>.

HOSOSAKA, Yasuko; HANAKI, Hideaki; ENDO, Harumi; SUZUKI, Yumiko; NAKAE, Taiji; NAGASAWA, Zenzo; OTSUKA, Yoshihito; SUNAKAWA, Keisuke. Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. **Journal of Infection and Chemotherapy**, vol. 13, no. 2, p. 79–86, Apr. 2007. <https://doi.org/10.1007/s10156-006-0502-7>.

HOU, Zhuru; LIU, Ling; WEI, Jianhong; XU, Benjin. Progress in the Prevalence, Classification and Drug Resistance Mechanisms of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Infection and Drug Resistance**, vol. Volume 16, p. 3271–3292, May 2023. <https://doi.org/10.2147/IDR.S412308>.

HUANG, Susan S.; DATTA, Rupak; PLATT, Richard. Risk of Acquiring Antibiotic-Resistant Bacteria From Prior Room Occupants. **Archives of Internal Medicine**, vol. 166, no. 18, p. 1945, 9 Oct. 2006. <https://doi.org/10.1001/archinte.166.18.1945>.

IWG-SCC. Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, vol. 53, no. 12, p. 4961–4967, Dec. 2009. <https://doi.org/10.1128/AAC.00579-09>.

JEVONS, M. Patricia. “Celbenin” - resistant Staphylococci. **British Medical Journal**, vol. 1, no. 5219, p. 124–125, 14 Jan. 1961. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5219.124-a>.

JOHNSON, Silvia. FemA of *Staphylococcus aureus*: Isolation and immunodetection. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 132, no. 3, p. 221–228, 15 Oct. 1995. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(95\)00314-U](https://doi.org/10.1016/0378-1097(95)00314-U).

JORGENSEN, James H.; PFALLER, Michael A.; CARROLL, Karen C.; FUNKE, Guido; LANDRY, Marie Louise; RICHTER, Sandra S.; WARNOCK, David W. **Manual of Clinical Microbiology**. 11th ed. Washington: American Society of Microbiology, 2015. <https://doi.org/10.1128/9781555817381>.

JOSHI, Seema; MUMTAZ, Sana; SINGH, Jyotsna; PASHA, Santosh; MUKHOPADHYAY, Kasturi. Novel Miniature Membrane Active Lipopeptidomimetics against Planktonic and Biofilm Embedded Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Scientific Reports**, vol. 8, no. 1, p. 1021, 18 Dec. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17234-z>.

JUNIOR, Aluisio Martins; MORONI, Juliana Gerhardt; DE SOUZA, Juliana Morandini; BUSARELLO, Thais de Oliveira; DE OLIVEIRA, Carla Sakuma; GIANCURSI, Thiago Simões; MOREIRA, João Pedro Silva; ERKMANN, Vinicius Furlan; DA SILVA, Vinicius Rodrigues; ORLANDO, Brunno Luis Brugnera; DA SILVA, Adélia Gonçalves. INFECÇÕES POR BACTÉRIAS DO GRUPO “ESKAPE” EM PACIENTES INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA POR COVID-19. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, vol. 27, p. 103373, Oct. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2023.103373>.

KAMPF, G.; ADENA, S.; RÜDEN, H; WEIST, Klaus. Inducibility and potential role of *mecA*-gene-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from colonized healthcare workers as a source for nosocomial infections. **Journal of Hospital Infection**, vol. 54, no. 2, p. 124–129, Jun. 2003. [https://doi.org/10.1016/S0195-6701\(03\)00119-1](https://doi.org/10.1016/S0195-6701(03)00119-1).

KANEKO, Jun; KIMURA, Takahiro; YOSHIYUKI, Kawakami; TOSHIO, Tomita; YOSHIYUKI, Kamio. Panton-Valentine Leukocidin Genes in a Phage-like Particle Isolated from Mitomycin C-Treated *Staphylococcus aureus* V8 (ATCC 49775). **Biosci. Biotech. Biochem.**, vol. 61, no. 11, p. 1960–1962, Jul. 1997. .

KHAN, Saleem A.; NOVICK, Richard P. Terminal nucleotide sequences of Tn551, a transposon specifying erythromycin resistance in *Staphylococcus aureus*: Homology with Tn3. **Plasmid**, vol. 4, no. 2, p. 148–154, Sep. 1980. [https://doi.org/10.1016/0147-619X\(80\)90004-9](https://doi.org/10.1016/0147-619X(80)90004-9).

KLUYTMANS, Jan; VAN BELKUM, Alex; VERBRUGH, Henri. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 10, no. 3, p. 505–520, Jul. 1997. .

KNIGHT, Gwenan M; GLOVER, Rebecca E; MCQUAID, C Finn; OLARU, Ioana D; GALLANDAT, Karin; LECLERC, Quentin J; FULLER, Naomi M; WILLCOCKS, Sam J; HASAN, Rumina; VAN KLEEF, Esther; CHANDLER, Clare IR. Antimicrobial resistance and COVID-19: Intersections and implications. **eLife**, vol. 10, 16 Feb. 2021. <https://doi.org/10.7554/eLife.64139>.

KOPP, URSULA; ROOS, MARTIN; WECKE, JÖRG; LABISCHINSKI, HARALD. Staphylococcal Peptidoglycan Interpeptide Bridge Biosynthesis: A Novel Antistaphylococcal Target? **Microbial Drug Resistance**, vol. 2, no. 1, p. 29–41, Jan. 1996. <https://doi.org/10.1089/mdr.1996.2.29>.

KORNBLUM, J.; HARTMAN, B. J.; NOVICK, R. P.; TOMASZ, A. Conversion of a homogeneously methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus* to heterogeneous resistance by Tn551-mediated insertional inactivation. **European Journal of Clinical Microbiology**, vol. 5, no. 6, p. 714–718, Dec. 1986. <https://doi.org/10.1007/BF02013311>.

LABISCHINSKI, Harald. Consequences of the interaction of β -lactam antibiotics with penicillin binding proteins from sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Medical Microbiology and Immunology**, vol. 181, no. 5, p. 241–265, Nov. 1992. <https://doi.org/10.1007/BF00198846>.

LABISCHINSKI, Harald; HOCHBERG, Michael; SIDOW, Thomas; MAIDHOF, Heinrich; HENZE, Uta; BERGER-BÄCHI, Brigitte; WECKE, Jörg. Biophysical and Biochemical Studies on the Fine Structure of the Sacculi from *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Bacterial Growth and Lysis**. Boston, MA: Springer US, 1993. p. 9–21. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9359-8_2.

LAKHUNDI, Sahreena; ZHANG, Kunyan. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 31, no. 4, p. 1–103, 12 Sep. 2018. <https://doi.org/10.1128/CMR.00020-18>.

LARSEN, Mette V.; COSENTINO, Salvatore; RASMUSSEN, Simon; FRIIS, Carsten; HASMAN, Henrik; MARVIG, Rasmus Lykke; JELSBÄK, Lars; SICHERITZ-PONTÉN, Thomas; USSERY, David W.; AARESTRUP, Frank M.; LUND, Ole. Multilocus Sequence Typing of Total-Genome-Sequenced Bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 50, no. 4, p. 1355–1361, Apr. 2012. <https://doi.org/10.1128/JCM.06094-11>.

LAVERTY, Garry; GORMAN, Sean P.; GILMORE, Brendan F. Biomolecular mechanisms of staphylococcal biofilm formation. **Future Microbiology**, vol. 8, no. 4, p. 509–524, Apr. 2013. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.7>.

LEE, Andie S; DE LENCASTRE, Hermínia; GARAU, Javier; KLUYTMANS, Jan; MALHOTRA-KUMAR, Surbhi; PESCHEL, Andreas; HARBARTH, Stephan. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Disease Primers**, vol. 4, no. 18033, p. 18033, 31 May 2018. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>.

LI, X.; XIONG, Y.; FAN, X.; FENG, P.; TANG, H.; ZHOU, T. The role of *femA* regulating gene on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **Médecine et Maladies Infectieuses**, vol. 42, no. 5, p. 218–225, May 2012. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2008.09.031>.

LIANG, Bingshao; XIONG, Zhile; LIANG, Zhuwei; ZHANG, Chao; CAI, Hao; LONG, Yan; GAO, Fei; WANG, Jielin; DENG, Qiulian; ZHONG, Huamin; XIE, Yongqiang; HUANG, Lianfen; GONG, Sitang; ZHOU, Zhenwen. Genomic Basis of Occurrence of Cryptic Resistance among Oxacillin- and Cefoxitin-Susceptible *mecA* -Positive *Staphylococcus aureus*. **Microbiology Spectrum**, vol. 10, no. 3, 29 Jun. 2022. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00291-22>.

LIN, Derek M; KOSKELLA, Britt; LIN, Henry C. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**, vol. 8, no. 3, p. 162, 2017. <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v8.i3.162>.

LINDSAY, Jodi A.; HOLDEN, Matthew T.G. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? **Trends in Microbiology**, vol. 12, no. 8, p. 378–385, Aug. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.06.004>.

LIU, Jun-Lan; LI, Tian-Ming; ZHONG, Ni; WANG, Xing; JIANG, Jie; ZHANG, Wen-Xia; TANG, Rong; GUO, Yin-Juan; LIU, Yun; HU, Jiang; HE, Li-Hua; TANG, Jin; WU, Wen-Juan; LI, Min. Current status of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* infection in Shanghai, China: A multicenter study. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, vol. 54, no. 6, p. 1070–1077, Dec. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.07.021>.

LIU, Roushan; ZHANG, Jian; DU, Xiaoli; LV, Yingying; GAO, Xiangyu; WANG, Yanyan; WANG, Junrui. Clonal Diversity, Low-Level and Heterogeneous Oxacillin Resistance of Oxacillin Sensitive MRSA. **Infection and Drug Resistance**, vol. Volume 14, p. 661–669, Feb. 2021. <https://doi.org/10.2147/IDR.S288991>.

LOBANOVSKA, Mariya; PILLA, Giulia. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? **The Yale journal of biology and medicine**, vol. 90, no. 1, p. 135–145, Mar. 2017. .

LOZANO, C.; ASPIROZ, C.; ARA, M.; GÓMEZ-SANZ, E.; ZARAZAGA, M.; TORRES, C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 in a farmer with skin lesions and in pigs of his farm: clonal relationship and detection of *lnu(A)* gene. **Clinical Microbiology and Infection**, vol. 17, no. 6, p. 923–927, Jun. 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03437.x>.

LPSN. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. 2024. Available at: <https://lpsn.dsmz.de/genus/staphylococcus>. Accessed on: 20 Feb. 2024.

MA, Mingbiao; CHU, Minjun; TAO, Lvyan; LI, Jue; LI, Xiaojuan; HUANG, Hailin; QU, Kexuan; WANG, Haiping; LI, Li; DU, Tingyi. First Report of Oxacillin Susceptible *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* in a Children's Hospital in Kunming, China. **Infection and Drug Resistance**, vol. Volume 14, p. 2597–2606, Jul. 2021. <https://doi.org/10.2147/IDR.S317670>.

MA, Xiao Xue; SUN, Dan Dan; WANG, Si; WANG, Mei Lian; LI, Miao; SHANG, Hong; WANG, En Hua; LUO, En Jie. Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among preclinical medical students: epidemiologic and molecular characteristics of methicillin-resistant *S. aureus* clones. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, vol. 70, no. 1, p. 22–30, May 2011. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.004>.

MAHJABEEN, Fatema; SAHA, Utsow; MOSTAFA, Mayesha N; SIDDIQUE, Farzana; AHSAN, Eram; FATHMA, Sawsan; TASNIM, Anika; RAHMAN, Tasnim; FARUQ, Ridwan; SAKIBUZZAMAN, Md; DILNAZ, Fahmida; ASHRAF, Adrita. An Update on Treatment Options for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Bacteremia: A Systematic Review. **Cureus**, 14 Nov. 2022. <https://doi.org/10.7759/cureus.31486>.

MAIDHOF, HEINRICH; REINICKE, BERNHARD; BLÜMEL, Peter; BERGER-BÄCHI, BRIGITTE; LABISCHINSKI, HARALD. *femA*, which encodes a factor essential for expression of methicillin resistance, affects glycine content of peptidoglycan in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Bacteriology**, vol. 173, no. 11, p. 3507–3513, Jun. 1991. <https://doi.org/10.1128/jb.173.11.3507-3513.1991>.

MILHEIRIÇO, Catarina; OLIVEIRA, Duarte C.; LENCASTRE, Herminia de. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 51, no. 9, p. 3374–3377, Sep. 2007. <https://doi.org/10.1128/AAC.00275-07>.

MLYNARCZYK-BONIKOWSKA, Beata; KOWALEWSKI, Cezary; KROLAK-ULINSKA, Aneta; MARUSZA, Wojciech. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 23, no. 15, p. 8088, 22 Jul. 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23158088>.

MONTEIRO, João M.; COVAS, Gonçalo; RAUSCH, Daniela; FILIPE, Sérgio R.; SCHNEIDER, Tanja; SAHL, Hans-Georg; PINHO, Mariana G. The pentaglycine bridges of *Staphylococcus aureus* peptidoglycan are essential for cell integrity. **Scientific Reports**, vol. 9, no. 1, p. 5010, 21 Mar. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41461-1>.

MULCAHY, Michelle E.; GEOGHEGAN, Joan A.; MONK, Ian R.; O'KEEFFE, Kate M.; WALSH, Evelyn J.; FOSTER, Timothy J.; MCLOUGHLIN, Rachel M. Nasal Colonisation by *Staphylococcus aureus* Depends upon Clumping Factor B Binding to the Squamous Epithelial Cell Envelope Protein Loricrin. **PLoS Pathogens**, vol. 8, no. 12, p. e1003092, 27 Dec. 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003092>.

MURAKAMI, K; MINAMIDE, W; WADA, K; NAKAMURA, E; TERAOKA, H; WATANABE, S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 29, no. 10, p. 2240–2244, Oct. 1991. <https://doi.org/10.1128/jcm.29.10.2240-2244.1991>.

MURRAY, Christopher J L; IKUTA, Kevin Shunji; SHARARA, Fablina; SWETSCHINSKI, Lucien; ROBLES AGUILAR, Gisela; GRAY, Authia; HAN, Chieh; BISIGNANO, Catherine; RAO, Puja; WOOL, Eve; JOHNSON, Sarah C.; BROWNE, Annie J.; CHIPETA, Michael Give; FELL, Frederick; HACKETT, Sean; HAINES-WOODHOUSE, Georgina; KASHEF HAMADANI, Bahar H.; KUMARAN, Emmanuelle A P; MCMANIGAL, Barney; ... NAGHAVI, Mohsen. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, vol. 399, no. 10325, p. 629–655, Feb. 2022. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).

NHAN, T.-X.; LECLERCQ, R.; CATTOIR, V. Prevalence of toxin genes in consecutive clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and clinical impact. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, vol. 30, no. 6, p. 719–725, 12 Jun. 2011. <https://doi.org/10.1007/s10096-010-1143-4>.

NOBLE, W. C.; WILLIAMS, R. E. O.; JEVONS, M. P.; SHOOTER, R. A. Some aspects of nasal carriage of staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**, vol. 17, no. 1, p. 79–83, 1 Jan. 1964. <https://doi.org/10.1136/jcp.17.1.79>.

OCHIENG' ODUOR, Joseph M.; ONKOBA, Nyamongo; MALOBA, Fredrick; NYACHIEO, Atunga. Experimental phage therapy against haematogenous multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia in mice. **African Journal of Laboratory Medicine**, vol. 5, no. 1, 1 Feb. 2016. <https://doi.org/10.4102/ajlm.v5i1.435>.

OLUFUNMISO, Olajuyigbe; TOLULOPE, Ikpehae; ROGER, Coopposamy. Multidrug and vancomycin resistance among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from different teaching hospitals in Nigeria. **African Health Sciences**, vol. 17, no. 3, p. 797, 18 Sep. 2017. <https://doi.org/10.4314/ahs.v17i3.23>.

PARK, S.Y.; CHUNG, D.R.; YOO, J.R.; BAEK, J.Y.; KIM, S.H.; HA, Y.E.; KANG, C.-I.; PECK, K.R.; LEE, N.Y.; SONG, J.-H. Sequence type 72 community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged as a predominant clone of nasal colonization in newly admitted patients. **Journal of Hospital Infection**, vol. 93, no. 4, p. 386–389, Aug. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2015.12.008>.

PATEL, M.; WAITES, K.B.; HOESLEY, C.J.; STAMM, A.M.; CANUPP, K.C.; MOSER, S.A. Emergence of USA300 MRSA in a tertiary medical centre: implications for epidemiological studies. **Journal of Hospital Infection**, vol. 68, no. 3, p. 208–213, Mar. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2007.12.010>.

PDI-UEL. Hospital Universitário: mais de 113 mil atendimentos. 2024. Available at: <https://sites.uel.br/pdi/hospital-universitario-mais-de-113-mil-atendimentos/#:~:text=O Hospital Universitário possui hoje 431 leitos>. Accessed on: 20 Feb. 2024.

PHAKU, P.; LEBUGHE, M.; STRAUSS, L.; PETERS, G.; HERRMANN, M.; MUMBA, D.; MELLMANN, A.; MUYEMBE-TAMFUM, J.-J.; SCHAUMBURG, F. Unveiling the molecular basis of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* from the Democratic Republic of the Congo using whole genome sequencing. **Clinical Microbiology and Infection**, vol. 22, no. 7, p. 644.e1-644.e5, Jul. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.04.009>.

PILLAI, Satish K.; WENNERSTEN, Christine; VENKATARAMAN, Lata; ELIOPOULOS, George M.; MOELLERING, Robert C.; KARCHMER, Adolf W. Development of Reduced Vancomycin Susceptibility in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, vol. 49, no. 8, p. 1169–1174, 15 Oct. 2009. <https://doi.org/10.1086/605636>.

POPOVICH, K. J.; WEINSTEIN, R. A.; HOTA, B. Are Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Strains Replacing Traditional Nosocomial MRSA Strains? **Clinical Infectious Diseases**, vol. 46, no. 6, p. 787–794, 15 Mar. 2008. <https://doi.org/10.1086/528716>.

POULAKOU, Garyphallia; LAGOU, Styliani; TSIODRAS, Sotirios. What's new in the epidemiology of skin and soft tissue infections in 2018? **Current Opinion in Infectious Diseases**, vol. 30, no. 2, p. 1, Jan. 2019. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000527>.

POURNARAS, Spyros; SABAT, Artur; GRUNDMANN, Hajo; HENDRIX, Ron; TSAKRIS, Athanasios; FRIEDRICH, Alexander. Driving Forces of Mechanisms Regulating Oxacillin-Resistance Phenotypes of MRSA: Truly Oxacillin-Susceptible *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates also Exist. **Current Pharmaceutical Design**, vol. 21, no. 16, p. 2048–2053, 27 Apr. 2015. <https://doi.org/10.2174/1381612821666150310103754>.

POWERS, Michael E.; WARDENBURG, Juliane Bubeck. Igniting the Fire: *Staphylococcus aureus* Virulence Factors in the Pathogenesis of Sepsis. **PLoS Pathogens**, vol. 10, no. 2, p. e1003871, 13 Feb. 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003871>.

RAHMAN, Shakilur; RAJAK, Karunamoy; MISHRA, Sabyashachi; DAS, Amit Kumar. Identification of potential inhibitors against FemX of *Staphylococcus aureus*: A hierarchical *in-silico* drug repurposing approach. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, vol. 115, no. February, p. 108215, Sep. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2022.108215>.

RAMMELKAMP, Charles H.; MAXON, Thelma. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the Action of Penicillin. **Experimental Biology and Medicine**, vol. 51, no. 3, p. 386–389, 1 Dec. 1942. <https://doi.org/10.3181/00379727-51-13986>.

REYNOLDS, Peter E.; FULLER, Christopher. Methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*; presence of identical additional penicillin-binding protein in all strains examined. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 33, no. 2–3, p. 251–254, Feb. 1986. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1986.tb01281.x>.

ROHRER, S.; BERGER-BÄCHI, B. FemABX Peptidyl Transferases: a Link between Branched-Chain Cell Wall Peptide Formation and β -Lactam Resistance in Gram-Positive Cocci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 47, no. 3, p. 837–846, Mar. 2003. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.3.837-846.2003>.

RONGPHARPI, Sharon Rainy; HAZARIKA, Naba Kumar; KALITA, HiteSh. The Prevalence of Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* Among Healthcare Workers at a Tertiary Care Hospital in Assam with Special Reference to MRSA. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, vol. 7, no. 2, p. 257–260, Feb. 2013. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/4320.2741>.

ROSSI, Flávia; DIAZ, Lorena; WOLLAM, Aye; PANESSO, Diana; ZHOU, Yanjiao; RINCON, Sandra; NARECHANIA, Apurva; XING, Galen; DI GIOIA, Thais S.R.; DOI, André; TRAN, Truc T.; REYES, Jinnethe; MUNITA, Jose M.; CARVAJAL, Lina P.; HERNANDEZ-ROLDAN, Alejandra; BRANDÃO, Denise; VAN DER HEIJDEN, Inneke Marie; MURRAY, Barbara E.; PLANET, Paul J.; ... ARIAS, Cesar A. Transferable Vancomycin Resistance in a Community-Associated MRSA Lineage. **New England Journal of Medicine**, vol. 370, no. 16, p. 1524–1531, 17 Apr. 2014. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1303359>.

SAKOULAS, George; GOLD, Howard S; VENKATARAMAN, Lata; DEGIROLAMI, Paola C; ELIOPOULOS, George M; QIAN, Qinfang. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Comparison of Susceptibility Testing Methods and Analysis of *mecA*-Positive Susceptible Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 39, no. 11, p. 3946–3951, Nov. 2001. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.11.3946>.

SARKAR, Abdullah; RAJI, Adeola; GARAWEEN, Ghada; SOGE, Olusegun; REY-LADINO, Jose; AL-KATTAN, Wael; SHIBL, Atef; SENOK, Abiola. Antimicrobial resistance and virulence markers in methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* isolates associated with nasal colonization. **Microbial Pathogenesis**, vol. 93, p. 8–12, Apr. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.01.008>.

SAUVAGE, Eric; KERFF, Frédéric; TERRAK, Mohammed; AYALA, Juan A.; CHARLIER, Paulette. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. **FEMS Microbiology Reviews**, vol. 32, no. 2, p. 234–258, Mar. 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x>.

SCHAFFER, Adam C.; SOLINGA, Robert M.; COCCHIARO, Jordan; PORTOLES, Marta; KISER, Kevin B.; RISLEY, Allison; RANDALL, Suzanne M.; VALTULINA, Viviana; SPEZIALE, Pietro; WALSH, Evelyn; FOSTER, Timothy; LEE, Jean C. Immunization with *Staphylococcus aureus* Clumping Factor B, a Major Determinant in Nasal Carriage, Reduces Nasal Colonization in a Murine Model. **Infection and Immunity**, vol. 74, no. 4, p. 2145–2153, 1 Apr. 2006. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.4.2145-2153.2006>.

SCHWENDENER, Sybille; COTTING, Kerstin; PERRETEN, Vincent. Novel methicillin resistance gene *mecD* in clinical *Macrococcus caseolyticus* strains from bovine and canine sources. **Scientific Reports**, vol. 7, no. 1, p. 43797, 8 Dec. 2017. <https://doi.org/10.1038/srep43797>.

SEEMANN, Torsten. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, vol. 30, no. 14, p. 2068–2069, 15 Jul. 2014. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.

SEYBOLD, U.; KOURBATOVA, E. V.; JOHNSON, J. G.; HALVOSA, S. J.; WANG, Y. F.; KING, M. D.; RAY, S. M.; BLUMBERG, H. M. Emergence of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* USA300 Genotype as a Major Cause of Health Care--Associated Blood Stream Infections. **Clinical Infectious Diseases**, vol. 42, no. 5, p. 647–656, 1 Mar. 2006. <https://doi.org/10.1086/499815>.

SHOAIB, Muhammad; AQIB, Amjad Islam; MUZAMMIL, Iqra; MAJEED, Noreen; BHUTTA, Zeeshan Ahmad; KULYAR, Muhammad Fakhar-e-Alam; FATIMA, Mahreen; ZAHEER, C-Neen Fatima; MUNEEB, Afshan; MURTAZA, Maheen; KASHIF, Muhammad; SHAFQAT, Furqan; PU, Wanxia. MRSA compendium of epidemiology, transmission, pathophysiology, treatment, and prevention within one health framework. **Frontiers in Microbiology**, vol. 13, 10 Jan. 2023. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1067284>.

SHRESTHA, Looniva; KAYAMA, Shizuo; SASAKI, Michiko; KATO, Fuminori; HISATSUNE, Junzo; TSURUDA, Keiko; KOIZUMI, Kazuhisa; TATSUKAWA, Nobuyuki; YU, Liansheng; TAKEDA, Kei; SUGAI, Motoyuki. Inhibitory effects of antibiofilm compound 1 against *Staphylococcus aureus* biofilms. **Microbiology and Immunology**, vol. 60, no. 3, p. 148–159, Mar. 2016. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12359>.

SONG, Yunjia; CUI, Lanqing; LV, Yuan; LI, Yun; XUE, Feng. Characterisation of clinical isolates of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* in China from 2009 to 2014. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, vol. 11, p. 1–3, Dec. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.05.009>.

SPAULDING, Adam R.; SALGADO-PABON, W.; KOHLER, Petra L.; HORSWILL, Alexander R.; LEUNG, D. Y. M.; SCHLIEVERT, Patrick M. Staphylococcal and Streptococcal Superantigen Exotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 26, no. 3, p. 422–447, 1 Jul. 2013. <https://doi.org/10.1128/CMR.00104-12>.

STRANDÉN, Anne M.; EHLERT, Kerstin; LABISCHINSKI, Harald; BERGER-BÄCHI, B. Cell wall monoglycine cross-bridges and methicillin hypersusceptibility in a *femAB* null mutant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, vol. 179, no. 1, p. 9–16, Jan. 1997. <https://doi.org/10.1128/jb.179.1.9-16.1997>.

THOMER, Lena; SCHNEEWIND, Olaf; MISSIAKAS, Dominique. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections. **Annual Review of Pathology**, vol. 11, no. 1, p. 343–364, 23 May 2016. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044351>.

TIWARI, H. K.; SAPKOTA, D.; SEN, M. R. Evaluation of different tests for detection of *Staphylococcus aureus* using coagulase (*coa*) gene PCR as the gold standard. **Nepal Medical College journal**, vol. 10, no. 2, p. 129–131, Jun. 2008. .

VAILLANCOURT, Mylene; JORTH, Peter. The Unrecognized Threat of Secondary Bacterial Infections with COVID-19. **mBio**, vol. 11, no. 4, 25 Aug. 2020. <https://doi.org/10.1128/mBio.01806-20>.

VOLLMER, Waldemar; BLANOT, Didier; DE PEDRO, Miguel A. Peptidoglycan structure and architecture. **FEMS Microbiology Reviews**, vol. 32, no. 2, p. 149–167, Mar. 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x>.

WALSH, Evelyn J.; O'BRIEN, Louise M.; LIANG, Xiaowen; HOOK, Magnus; FOSTER, Timothy J. Clumping Factor B, a Fibrinogen-binding MSCRAMM (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) Adhesin of *Staphylococcus aureus*, Also Binds to the Tail Region of Type I Cytokeratin 10. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 279, no. 49, p. 50691–50699, 3 Dec. 2004. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408713200>.

WALTERS, Maroya Spalding; EGGERS, Paula; ALBRECHT, Valerie; TRAVIS, Tatiana; LONSWAY, David; HOVAN, Greg; TAYLOR, Debra; RASHEED, Kamile; LIMBAGO, Brandi; KALLEN, Alexander. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* — Delaware, 2015. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, vol. 64, no. 37, p. 1056, 25 Sep. 2015. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6437a6>.

WANG, Jiun-Ling; WANG, Jann-Tay; CHEN, Shey-Ying; CHEN, Yee-Chun; CHANG, Shan-Chwen. Distribution of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Types and Correlation with Comorbidity and Infection Type in Patients with MRSA Bacteremia. **PLoS ONE**, vol. 5, no. 3, p. e9489, 5 Mar. 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009489>.

WEINER-LASTINGER, Lindsey M.; ABNER, Sheila; EDWARDS, Jonathan R.; KALLEN, Alexander J.; KARLSSON, Maria; MAGILL, Shelley S.; POLLOCK, Daniel; SEE, Isaac; SOE, Minn M.; WALTERS, Maroya S.; DUDECK, Margaret A. Antimicrobial-resistant pathogens associated with adult healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015–2017. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, vol. 41, no. 1, p. 1–18, 26 Jan. 2020. <https://doi.org/10.1017/ice.2019.296>.

WERTHEIM, Heiman F. L.; WALSH, Evelyn; CHOUDHURRY, Roos; MELLES, Damian C.; BOELEN, Hélène A. M.; MIAJLOVIC, Helen; VERBRUGH, Henri A.; FOSTER, Timothy; VAN BELKUM, Alex. Key Role for Clumping Factor B in *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization of Humans. **PLoS Medicine**, vol. 5, no. 1, p. e17, 15 Jan. 2008. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050017>.

WOLSKA-GĒBARZEWSKA, Mariola; MIĘDZOBRODZKI, Jacek; KOSECKA-STROJEK, Maja. Current types of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) in clinically relevant coagulase-negative staphylococcal (CoNS) species. **Critical Reviews in Microbiology**, vol. 0, no. 0, p. 1–17, 26 Oct. 2023. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2023.2274841>.

WU, SHANG WEI; DE LENCASTRE, HERMINIA; TOMASZ, ALEXANDER. The *Staphylococcus aureus* Transposon Tn551: Complete Nucleotide Sequence and Transcriptional Analysis of the Expression of the Erythromycin Resistance Gene. **Microbial Drug Resistance**, vol. 5, no. 1, p. 1–7, Jan. 1999. <https://doi.org/10.1089/mdr.1999.5.1>.

XU, Stacey X.; MCCORMICK, John K. Staphylococcal superantigens in colonization and disease. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, vol. 2, p. 1–11, Apr. 2012. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00052>.

YAMAMOTO, Tatsuo; NISHIYAMA, Akihito; TAKANO, Tomomi; YABE, Shizuka; HIGUCHI, Wataru; RAZVINA, Olga; SHI, Da. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: community transmission, pathogenesis, and drug resistance. **Journal of Infection and Chemotherapy**, vol. 16, no. 4, p. 225–254, Mar. 2010. <https://doi.org/10.1007/s10156-010-0045-9>.

YOUNG, Bernadette C; WU, Chieh-Hsi; GORDON, N Claire; COLE, Kevin; PRICE, James R; LIU, Elia; SHEPPARD, Anna E; PERERA, Sanuki; CHARLESWORTH, Jane; GOLUBCHIK, Tanya; IQBAL, Zamin; BOWDEN, Rory; MASSEY, Ruth C; PAUL, John; CROOK, Derrick W; PETO, Timothy E; WALKER, A Sarah; LLEWELYN, Martin J; WYLLIE, David H; WILSON, Daniel J. Severe infections emerge from commensal bacteria by adaptive evolution. **eLife**, vol. 6, p. 1–25, 19 Dec. 2017.
<https://doi.org/10.7554/eLife.30637>.

ZANKARI, Ea; HASMAN, Henrik; COSENTINO, Salvatore; VESTERGAARD, Martin; RASMUSSEN, Simon; LUND, Ole; AARESTRUP, Frank M.; LARSEN, Mette Voldby. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 67, no. 11, p. 2640–2644, 1 Nov. 2012.
<https://doi.org/10.1093/jac/dks261>.